

Aus der Abteilung für Innere Medizin
des Evangelischen Krankenhauses Königin Elisabeth,
Akademisches Lehrkrankenhaus der Humboldt-Universität zu Berlin
Direktor Prof. Dr. med. K.-L. Schulte

DISSERTATION

“Zirkulierende Thrombozyten im Rahmen der intraarteriellen digitalen Subtraktionsangiographie und der perkutanen transluminalen Angioplastie: Durchflußzytometrische Bestimmung der Aktivierung ex vivo und in vitro”

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
[Dr. med.]

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herrn Alexander Buchholz
geb. am 29.12.1970 in Staaken

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
 2. Prof. Dr. med. L. Röcker
 3. Prof. Dr. med. K.-L. Schulte

eingereicht: im September 1998

Datum der Promotion: 13.09.1999

Abstract

Platelet activation plays a crucial role in the pathogenesis of atherosclerosis. Circulating activated platelets are thought to trigger thrombotic events in patients with unstable angina pectoris, myocardial infarction and transient ischaemic attacks as well as after coronary angioplasty and surgery.

We studied the effect of peripheral arterial disease (PAD) on activation of circulating thrombocytes and evaluated the influence on platelet activation of intraarterial digital subtraction angiography (DSA) and percutaneous transluminal angioplasty (PTA) in the area of the lower extremities.

Our study included sixteen control subjects with PAD, twenty-five healthy control subjects and thirty-six patients, fourteen of whom were undergoing DSA, twelve were undergoing PTA and ten we examined during both interventions. Blood samples were obtained from a peripheral vein or from the arterial and venous catheter introducer before and directly and four hours after the procedures. To characterize platelet activation, the expression of activation-dependent platelet antigens (CD62 and CD63) was measured using flow cytometry. Platelet sensibility was analysed by an additional in-vitro-activation.

Four hours after DSA, we observed a decrease in activation and an increase in sensibility of thrombocytes in both arterial and venous circulation ($p < 0.02$), most likely due the contrast medium (CM). We assume, that the relative decrease of platelet activation is caused by a reduced life-time. The relative number of activated thrombocytes decreased in both arterial and venous circulation ($p < 0.02$) four hours after PTA. Furthermore, we observed reduced amounts of activated platelets in the arterial circulation ($p = 0.021$) immediately after PTA, in correlation with increased times of dilatation and larger balloon-catheters ($p < 0.03$). This could be explained by slight migration or shortened life-time of activated thrombocytes. The amount of CM and heparin did not have a pronounced effect. The influence of both interventions on the platelet features and functions seemed to attenuate in the four postinterventional hours.

Our results show that angioplasty in peripheral vessels causes activation and presumably slight migration or reduced life-time of circulating thrombocytes immediately and four hours after PTA. We postulate that this is mainly induced by dilatation. DSA was also found to be associated with platelet activation, sensibilisation and presumptive minor migration or shortened life-time of circulating platelets.

More activated and sensitized thrombocytes circulated in patients with PAD (clinical stage II according to Fontaine) with cardiovascular risk-factors compared to healthy control subjects ($p = 0.001$). This supports our assumption that preactivated platelets are particularly involved in activation, sensitizing and migration processes or affected by a reduced life-time.

Zusammenfassung

Die Thrombozytenaktivierung ist von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Arteriosklerose und wird bei Patienten mit instabiler Angina pectoris, Myokardinfarkt und TIA sowie nach koronarangioplastischen und operativen Eingriffen als Verursacher okklusiver vaskulärer Ereignisse in Betracht gezogen.

Wir gingen der Frage nach, ob ein Zusammenhang zwischen peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) und der Aktivierung zirkulierender Thrombozyten besteht und ob die intraarterielle digitale Subtraktionsangiographie (DSA) sowie die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) im Bereich der unteren Extremitäten die Aktivierung zirkulierender Plättchen beeinflussen.

Unsere Studie schloß 16 Kontrollprobanden mit PAVK, 25 gesunde Kontrollprobanden und 36 Patienten ein, von denen 14 einer DSA, 12 einer PTA und 10 beiden Eingriffen unterzogen wurden. Wir entnahmen Blutproben aus einer peripheren Vene oder aus Einführungsbestecken in der Arteria und Vena femoralis vor, direkt nach und 4 h nach den Interventionen. Die Plättchenaktivierung wurde anhand durchflußzytometrischer Messungen der Expression aktivierungsspezifischer Antigene (CD62 und CD63) bestimmt, die Sensibilität der Thrombozyten analysierten wir mittels einer zusätzlichen in-vitro-Aktivierung.

Wir beobachteten 4 h nach der DSA einen Abfall der Aktivierung und eine erhöhte Sensibilität von Plättchen im arteriellen und venösen Strombereich ($p < 0,02$). Wir sehen diese Wirkungen als Kontrastmittel(KM)-induziert an und führen die Abnahme der Relativzahl aktivierter Thrombozyten hauptsächlich auf ihre verkürzte Lebensdauer zurück. 4 h nach der PTA kam es arteriell und venös zu einem Abfall der Relativzahl aktivierter Thrombozyten ($p < 0,02$). Weiterhin beobachteten wir unmittelbar nach der PTA eine Verringerung des prozentualen Anteils aktivierter Plättchen in der arteriellen Zirkulation ($p = 0,021$) in Korrelation mit zunehmenden Dilatationszeiten und Ballonlängen ($p < 0,03$). Diese Beobachtungen führen wir auf eine geringe Anlagerung bzw. reduzierte Lebensdauer aktivierter Thrombozyten zurück. Von geringer quantitativer Bedeutung waren Einflüsse des Heparins und KM. Die Wirkung der DSA und PTA auf die Thrombozytenfunktionen schien sich in den 4 postinterventionellen Stunden abzuschwächen.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Angioplastie in peripheren Gefäßen eine Aktivierung und vermutlich geringe Anlagerung bzw. verkürzte Lebensdauer zirkulierender Plättchen unmittelbar nach der PTA und 4 Stunden später verursacht. Diese Prozesse führen wir in erster Linie auf Endothelläsionen als Folge der Dilatation zurück. Die DSA führt 4 h nach dem Eingriff zu einer Aktivierung, Sensibilisierung und in wahrscheinlich sehr geringem Umfang zu einer Anlagerung bzw. verringerten Lebensdauer der Plättchen.

PAVK-Patienten im Stadium II nach Fontaine mit kardiovaskulären Risikofaktoren wiesen im Vergleich zu gesunden Probanden eine höhere Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Plättchen auf ($p = 0,0001$). Deshalb vermuten wir, daß präinterventionell aktivierte Plättchen besonders in die Prozesse Aktivierung, Sensibilisierung und Anlagerung involviert bzw. von einer verkürzten Lebensdauer betroffen sind.

Keywords:

platelet activation, peripheral arterial disease, percutaneous transluminal angioplasty, digital subtraction angiography, flow cytometry

Schlagwörter:

Thrombozytenaktivierung, periphere arterielle Verschlusskrankheit, perkutane transluminale Angioplastie, digitale Subtraktionsangiographie, Durchflußzytometrie

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. med. K.-L. Schulte für die Zurverfügungstellung des Themas und den ärztlichen Mitarbeitern der „Abteilung für Kardiovaskuläre Diagnostik“ der Charité für die Auswahl geeigneter Patienten.

Ein besonderes Wort des Dankes richte ich an Herrn Dr. med. L. Bruch. Während der gesamten Dauer der Studie bis zur Fertigstellung der Promotionsarbeit leitete er mich wissenschaftlich an und stand mir jederzeit bei fachlichen und organisatorischen Fragen äußerst entgegenkommend zur Seite.

Außerdem drücke ich meinen Dank gegenüber den Ärzten und Schwestern des Angiologen-Teams der Charité unter der Leitung von Herrn Oberarzt Dr. sc. med. L. Wierny für die Ermöglichung einer unproblematischen Abnahme der Blutproben während der Interventionen aus.

Die Ärzte und Schwestern der orthopädischen und gastroenterologischen Stationen der Charité schufen in einer sehr entgegenkommenden Weise die Voraussetzungen für die Blutabnahmen an Kontrollprobanden. Auch ihnen sei an dieser Stelle gedankt.

Bei den Mitarbeitern des „Instituts für klinische Immunologie“ (Leitung Prof. Dr. med. D. Volk) der Charité, vor allem bei Herrn OA Dr. med. W. Döcke, bedanke ich mich für die fachliche Hilfe und die Bereitstellung eines Arbeitsbereiches für die Aufbereitung und Messung der Blutproben.

Sehr dankbar bin Herrn Dr. med. A. Ruf vom „Institut für Medizinische Labordiagnostik“ des Klinikums Karlsruhe für die Bereitstellung des Stabilisierungsmittels CyFixII.

In meinen Dank schließe ich Frau I. Knebusch aus der Bibliothek des Zentrums für Innere Medizin der Charité ein. Sie stand mir bei der Literaturrecherche äußerst freundlich und hilfsbereit zur Seite.

Für die Anregungen bezüglich der statistischen Auswertung meiner Rohdaten bedanke ich mich bei Frau Dr. Küchler aus dem „Institut für Medizinische Informatik“ der Charité.

Widmung

Im Gedenken an meine Mutter und in Dankbarkeit meinem Vater.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Alexander Buchholz, geboren am 29.12.1970 in 13591 Berlin-Staaken, wohnhaft Pappelallee 7/8, 10437 Berlin, an Eides statt, die vorliegende Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.) mit dem Thema „Zirkulierende Thrombozyten im Rahmen der intraarteriellen digitalen Subtraktionsangiographie und der perkutanen transluminalen Angioplastie: Durchflußzytometrische Bestimmung der Aktivierung ex vivo und in vitro“ selbständig ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt zu haben. Die dargestellten Ergebnisse wurden in eigenständig durchgeführten Experimenten gewonnen. Diese Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die verwendeten Hilfsmittel und Literaturquellen sind vollständig angegeben.

Berlin, im September 1998

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	PAVK.....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Diagnostik.....	1
1.1.3	Therapie.....	2
1.2	BEDEUTUNG DER THROMBOZYTEN.....	2
1.2.1	Pathogenese der Arteriosklerose.....	2
1.2.2	Aktivierung der Thrombozyten.....	3
1.2.3	Klinische Relevanz.....	6
2	FRAGESTELLUNG.....	7
3	PATIENTEN UND METHODEN.....	8
3.1	ZUSAMMENSETZUNG DER GRUPPEN.....	8
3.2	EIGENSCHAFTEN DER GRUPPEN.....	9
3.3	METHODE DER BLUTENTNAHME UND AUFBEREITUNG DER PROBEN.....	11
3.3.1	Abnahme der Proben.....	12
3.3.2	Aufbereitung der Proben.....	12
3.4	MEBMETHODE.....	14
3.4.1	Aufbau und Funktionsweise des Meßgerätes.....	14
3.4.2	Voreinstellungen des Gerätes.....	16
3.4.3	Gating der Thrombozytenpopulation.....	16
3.4.4	Messung mit FITC-markierten Antikörpern.....	17
3.5	REPRODUZIERBARKEIT DER ERGEBNISSE.....	19
3.6	STATISTIK.....	19
3.6.1	Voraussetzungen.....	19
3.6.2	Vergleiche zwischen den Gruppen.....	20
3.6.3	Vergleiche innerhalb der Gruppen.....	20
3.6.4	Vergleiche zwischen den Interventionen.....	20
3.6.5	Bivariate Korrelation nach Spearman.....	21
4	ERGEBNISSE.....	22
4.1	VERGLEICHE MIT DEN KONTROLLGRUPPEN.....	22
4.1.1	Vergleich zwischen den Gruppen KG1 und KG2.....	23
4.1.2	Vergleich der Gruppe KG1 mit den Gruppen KM und PTA.....	25
4.2	VERGLEICHE INNERHALB DER GRUPPEN KM UND PTA.....	25
4.2.1	Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM.....	26
4.2.2	Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA.....	30

4.2.3	<i>Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten in der Gruppe KM</i>	34
4.2.4	<i>Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten in der Gruppe PTA</i>	34
4.3	VERGLEICH DER GRUPPE KM MIT DER GRUPPE PTA	34
4.3.1	<i>Vergleich der relativen prozentualen vor-nach-Differenzen</i>	34
4.3.2	<i>Vergleich der relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen</i>	37
4.4	EINFLÜSSE AUF DIE GRUPPEN KM UND PTA	39
4.4.1	<i>Einflüsse auf die relativen prozentualen vor-nach-Differenzen der Gruppe KM</i>	39
4.4.2	<i>Einflüsse auf die relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen der Gruppe KM</i>	41
4.4.3	<i>Einflüsse auf die relativen prozentualen vor-nach-Differenzen der Gruppe PTA</i>	44
4.4.4	<i>Einflüsse auf die relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen der Gruppe PTA</i>	49
5	DISKUSSION	54
5.1	VERGLEICHE MIT DEN KONTROLLGRUPPEN	54
5.1.1	<i>Vergleich zwischen den Gruppen KG1 und KG2</i>	54
5.1.2	<i>Vergleich der Gruppe KG1 mit den Gruppen KM und PTA</i>	57
5.2	VERGLEICHE INNERHALB DER GRUPPEN KM UND PTA	58
5.2.1	<i>Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM</i>	59
5.2.2	<i>Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA</i>	61
5.2.3	<i>Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten in der Gruppe KM</i>	63
5.2.4	<i>Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten in der Gruppe PTA</i>	63
5.3	VERGLEICH DER GRUPPE KM MIT DER GRUPPE PTA	64
5.4	EINFLÜSSE AUF DIE GRUPPEN KM UND PTA	65
5.4.1	<i>Einflüsse auf die Gruppe KM</i>	65
5.4.2	<i>Einflüsse auf die Gruppe PTA</i>	67
5.5	METHODENKRITIK	68
5.5.1	<i>Anforderungen an die Methode</i>	68
5.5.2	<i>Abnahme der Blutproben</i>	69
5.5.3	<i>Aufbereitung der Blutproben</i>	69
5.5.4	<i>Messung der Blutproben</i>	70
5.5.5	<i>Statistik</i>	72
6	ZUSAMMENFASSUNG	73

Abkürzungsverzeichnis¹

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphorsäure
arithm.	arithmetisch
art.	arteriell
ASS	Acetylsalicylsäure
BMI	Body-Mass-Index (Körpermassenindex)
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation (Differenzierungs-Antigen)
Δ MFI	Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (Medianwerte)
DSA	digitale Subtraktionsangiographie
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EDRF	endothelium-derived relaxing factor (vom Endothel freigesetzter Relaxations-Faktor)
FACSort	Fluorescence Activated Cell Sorter (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FITC	Fluorescein-Isothiocynat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
G	Gauge (21 Gauge = 0,813 mm)
Gly-Pro-Arg-Pro	Tetrapeptid (Glycin-Prolin-Arginin-Prolin)
GMP	granule membrane protein (granuläres Membranprotein)
GP	Glykoprotein
HDL	high density lipoproteins (Lipoproteine mit hoher Dichte)
I. E.	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KG	Kontrollgruppe
KHK	koronare Herzkrankheit

¹ SI-Präfixe und –Einheiten sowie abgeleitete Einheiten und Symbole sind nicht aufgeführt.

KM	Kontrastmittel
LDL	low density lipoproteins (Lipoproteine mit niedriger Dichte)
LIMP	lysosome integral membrane protein (lysosomal integriertes Membranprotein)
Max.	Maximum
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (Medianwerte)
Min.	Minimum
n	Anzahl
nat.	nativ
n. s.	nicht signifikant
p	relative Wahrscheinlichkeit
PADGEM	platelet activation-dependent granule external membrane protein (aktivierungsabhängiges externes Membranprotein in Thrombozytengranula)
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAVK	periphere arterielle Verschußkrankheit
PECAM	platelet-endothelial cell adhesion molecules (Zelladhäsionsmoleküle auf Thrombozyten und Endothelzellen)
PDGF	platelet derived growth factor (von Thrombozyten - und anderen Zellen - gebildeter Wachstumsfaktor)
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
r	Spearman`scher Korrelationskoeffizient
SI	Système International d'Unités (System internationaler Einheiten)
SPSS	statistical product and service solutions (statistische Produkt- und Dienstlösungen)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
ven.	venös
VLDL	very low density lipoproteins (Lipoproteine mit sehr niedriger Dichte)
vWF	von-Willebrand-Faktor
v/v	volume in volume (Volumen in Volumen; % v/v entspricht Volumenprozent)
w/v	weight in volume (Masse in Volumen; % w/v entspricht Massenprozent)
z. B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 DATEN AUS ANAMNESE UND PARAKLINIK (HÄUFIGKEIT DES AUFTRETENS UND PROZENTUALER ANTEIL DER MERKMALE IN DEN GRUPPEN, BEI DER VARIABLEN „ALTER“ ARITHM. MITTEL MIT STANDARDABWEICHUNG).....	10
TABELLE 2 INTERVENTIONSEINFLÜSSE IN DEN GRUPPEN (ARITHM. MITTEL UND STANDARDABWEICHUNGEN).....	11

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES AUFBAUS EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS (VERÄNDERT NACH [88])	14
ABB. 2: DARSTELLUNG DER POPULATIONEN IM SCATTERPLOT-DIAGRAMM FÜR FSC UND SSC AN EINEM BEISPIEL MIT ANGABE DER RELATIVEN LOGARITHMISCHEN STREULICHTINTENSITÄT (RGPIB IST DIE REGION, DIE ÜBER 95 % ALLER GPIB-POSITIVEN PARTIKEL ENTHÄLT.)	17
ABB. 3: DARSTELLUNG DER MEBREIHE EINES SETS IN 1-PARAMETER-HISTOGRAMMEN FÜR DIE FLUORESCENZ 1 AN EINEM BEISPIEL. DIE ABSZISSE GIBT DIE FLUORESCENZINTENSITÄT DER VERTEILUNG, DIE ORDINATE DIE ANZAHL VON ZELLEN PRO KLASSE AN. DIE TABELLEN IN DER RECHTEN BILDHÄLFTE ENTHALTEN AUSGEWÄHLTE STATISTISCHE PARAMETER DER VERTEILUNGEN.	18
ABB. 4: VERGLEICH VON KG1 MIT KG2 (NATIV, VENÖS, CD62); KG1 [3,68] > KG2 [1,88]; (P = 0,0001); ISOTYPKONTROLLEN: KG1 [1,62] < KG2 [1,75] (N. S.)	23
ABB. 5: VERGLEICH VON KG1 MIT KG2 (NATIV, VENÖS, CD63); KG1 [5,97] > KG2 [2,86] (P = 0,0001); ISOTYPKONTROLLEN: KG1 [1,62] < KG2 [1,75] (N. S.)	23
ABB. 6: VERGLEICH VON KG1 MIT KG2 (AKTIVIERT, VENÖS, CD62); KG1 [13,47] < KG2 [14,59] (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: KG1 [1,56] < KG2 [1,73] (N. S.)	24
ABB. 7: VERGLEICH VON KG1 MIT KG2 (AKTIVIERT, VENÖS, CD63); KG1 [13,4] > KG2 [7,64] (P = 0,0001); ISOTYPKONTROLLEN: KG1 [1,56] < KG2 [1,73] (N. S.)	24
ABB. 8: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE KM (NATIV, ARTERIELL, CD62); VOR [3,92] < NACH [3,96] (N. S.); VOR > 4 H NACH [3,54] (N. S.); NACH > 4 H NACH (P = 0,004); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,78] < NACH [1,91] > 4 H NACH [1,75] (N. S.)	26
ABB. 9: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE KM (NATIV, ARTERIELL, CD63); VOR [5,6] < NACH [5,67] (N. S.); VOR > 4 H NACH [5,5] (N. S.); NACH > 4 H NACH (P = 0,015); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,78] < NACH [1,91] > 4 H NACH [1,75] (N. S.)	26
ABB. 10: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE KM (NATIV, VENÖS, CD62); VOR [4] > NACH [3,81] (N. S.); VOR > 4 H NACH [3,64] (N. S.); NACH > 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,86] < NACH [1,87] > 4 H NACH [1,69] (N. S.)	27
ABB. 11: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE KM (NATIV, VENÖS, CD63); VOR [5,88] > NACH [5,52] (N. S.); VOR > 4 H NACH [5,4] (N. S.); NACH > 4 H NACH (P = 0,006); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,86] < NACH [1,87] > 4 H NACH [1,69] (N. S.)	27

-
- ABB. 12: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE KM (AKTIVIERT, ARTERIELL, CD62); VOR [10,14] < NACH [12,08] (N. S.); VOR < 4 H NACH [14,05] (P = 0,012); NACH < 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,9] > NACH [1,89] < 4 H NACH [1,92] (N. S.) 28**
- ABB. 13: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE KM (AKTIVIERT, ARTERIELL, CD63); VOR [11,56] < NACH [13,11] (N. S.); VOR < 4 H NACH [14,53] (P = 0,014); NACH < 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,9] > NACH [1,89] < 4 H NACH [1,92] (N. S.) 28**
- ABB. 14: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE KM (AKTIVIERT, VENÖS, CD62); VOR [11,14] < NACH [11,42] (N. S.); VOR < 4 H NACH [14,40] (P = 0,005); NACH < 4 H NACH (P = 0,009); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,92] > NACH [1,88] < 4 H NACH [1,91] (N. S.) 29**
- ABB. 15: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE KM (AKTIVIERT, VENÖS, CD63); VOR [10,7] < NACH [11,34] (N. S.); VOR < 4 H NACH [15,08] (P = 0,002); NACH < 4 H NACH (P = 0,004); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,92] > NACH [1,88] < 4 H NACH [1,91] (N. S.) 29**
- ABB. 16: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE PTA (NATIV, ARTERIELL, CD62); VOR [4,43] > NACH [4,26] (N. S.); VOR > 4 H NACH [3,36] (P = 0,019); NACH > 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,85] > NACH [1,78] > 4 H NACH [1,74] (N. S.) 30**
- ABB. 17: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE PTA (NATIV, ARTERIELL, CD63); VOR [5,6] > NACH [5,45] (N. S.); VOR > 4 H NACH [5,47] (N. S.); NACH < 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,85] > NACH [1,78] > 4 H NACH [1,74] (N. S.) 30**
- ABB. 18: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE PTA (NATIV, VENÖS, CD62); VOR [4,07] < NACH [4,09] (N. S.); VOR > 4 H NACH [3,34] (N. S.); NACH > 4 H NACH (P = 0,011); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,85] > NACH [1,84] > 4 H NACH [1,74] (N. S.) 31**
- ABB. 19: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE PTA (NATIV, VENÖS, CD63); VOR [5,5] < NACH [5,53] (N. S.); VOR > 4 H NACH [5,23] (N. S.); NACH > 4 H NACH (P = 0,005); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,85] > NACH [1,84] > 4 H NACH [1,74] (N. S.) 31**
- ABB. 20: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE PTA (AKTIVIERT, ARTERIELL, CD62); VOR [15,73] > NACH [12,81] (N. S.); VOR > 4 H NACH [14,46] (N. S.); NACH < 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,86] > NACH [1,84] > 4 H NACH [1,64] (N. S.) 32**
- ABB. 21: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE PTA (AKTIVIERT, ARTERIELL, CD63); VOR [19,04] > NACH [12,19] (N. S.); VOR < 4 H NACH [21,2] (N. S.); NACH < 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,86] > NACH [1,84] > 4 H NACH [1,64] (N. S.) 32**
- ABB. 22: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE PTA (AKTIVIERT, VENÖS, CD62); VOR [11,96] < NACH [12,61] (N. S.); VOR < 4 H NACH [14,4] (N. S.); NACH < 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,85] < NACH [1,86] > 4 H NACH [1,85] (N. S.) 33**
- ABB. 23: VERGLEICH DER ABNAHMEZEITPUNKTE IN DER GRUPPE PTA (AKTIVIERT, VENÖS, CD63); VOR [16,83] > NACH [14,66] (N. S.); VOR < 4 H NACH [18,98] (N. S.); NACH < 4 H NACH (N. S.); ISOTYPKONTROLLEN: VOR [1,85] < NACH [1,86] > 4 H NACH [1,85] (N. S.) 33**
- ABB. 24: VERGLEICH VON KM MIT PTA (NATIV, ARTERIELL, CD62); KM [-6,9] < PTA [2,61] (P = 0,021); WERTE VOR KM: [3,77]; MIN.: 2,86; MAX.: 5,28; WERTE VOR PTA: [3,63]; MIN.: 2,86; MAX.: 14,59; ISOTYPKONTROLLEN: KM [-2,38] < PTA [4,08] (N. S.) 35**

-
- ABB. 25:** VERGLEICH VON KM MIT PTA (NATIV, ARTERIELL, CD63); KM [-0,99] < PTA [0,06] (N. S.); WERTE VOR KM: [5,35]; MIN.: 4,7; MAX.: 7,23; WERTE VOR PTA: [5,41]; MIN.: 4,7; MAX.: 17; ISOTYPKONTROLLEN: KM [-2,38] < PTA [4,08] (N. S.) 35
- ABB. 26:** VERGLEICH VON KM MIT PTA (NATIV, VENÖS, CD62); KM [6,51] > PTA [0,5] (N. S.); WERTE VOR KM: [4,03]; MIN.: 3,11; MAX.: 5,38; WERTE VOR PTA: [3,8]; MIN.: 3,11; MAX.: 5,19; ISOTYPKONTROLLEN: KM [2,59] > PTA [-0,91] (N. S.) 36
- ABB. 27:** VERGLEICH VON KM MIT PTA (NATIV, VENÖS, CD63); KM [4,41] > PTA [0,98] (N. S.); WERTE VOR KM: [5,7]; MIN.: 4,87; MAX.: 7,3; WERTE VOR PTA: [5,4]; MIN.: 4,87; MAX.: 7,23; ISOTYPKONTROLLEN: KM [2,59] > PTA [-0,91] (N. S.) 36
- ABB. 28:** VERGLEICH VON KM MIT PTA (NATIV, ARTERIELL, CD62); KM [4,73] > PTA [4,47] (N. S.); WERTE VOR KM: [3,77]; MIN.: 2,86; MAX.: 5,28; WERTE VOR PTA: [3,63]; MIN.: 2,86; MAX.: 14,59; ISOTYPKONTROLLEN: KM [1,99] < PTA [2,08] (N. S.) 37
- ABB. 29:** VERGLEICH VON KM MIT PTA (NATIV, ARTERIELL, CD63); KM [7,28] > PTA [3,07] (N. S.); WERTE VOR KM: [5,35]; MIN.: 4,7; MAX.: 7,23; WERTE VOR PTA: [5,41]; MIN.: 4,7; MAX.: 17; ISOTYPKONTROLLEN: KM [1,99] < PTA [2,08] (N. S.) 37
- ABB. 30:** VERGLEICH VON KM MIT PTA (NATIV, VENÖS, CD62); KM [8,13] > PTA [6,05] (N. S.); WERTE VOR KM: [4,03]; MIN.: 3,11; MAX.: 5,38; WERTE VOR PTA: [3,8]; MIN.: 3,11; MAX.: 5,19; ISOTYPKONTROLLEN: KM [0,96] < PTA [1,96] (N. S.) 38
- ABB. 31:** VERGLEICH VON KM MIT PTA (NATIV, VENÖS, CD63); KM [6,98] > PTA [4,35] (N. S.); WERTE VOR KM: [5,7] MIN.: 4,87; MAX.: 7,3; WERTE VOR PTA: [5,4]; MIN.: 4,87; MAX.: 7,23; ISOTYPKONTROLLEN: KM [0,96] < PTA [1,96] (N. S.) 38
- ABB. 32:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER DSA AUF CD62, AKTIVIERT, ARTERIELL (N = 24); R = - 0,14 (N. S.); WERTE VOR KM: [10,14]; MIN.: 5,57; MAX.: 37,52; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,07 (N. S.) 39
- ABB. 33:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER DSA AUF CD63, AKTIVIERT, ARTERIELL (N = 24); R = - 0,01 (N. S.); WERTE VOR KM: [11,56]; MIN.: 5,57; MAX.: 29,43; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,07 (N. S.) 40
- ABB. 34:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER DSA AUF CD62, AKTIVIERT, VENÖS (N = 24); R = 0,22 (N. S.); WERTE VOR KM: [11,14]; MIN.: 5,14; MAX.: 37,52; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,14 (N. S.) 40
- ABB. 35:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER DSA AUF CD63, AKTIVIERT, VENÖS (N = 24); R = 0,08 (N. S.); WERTE VOR KM: [10,7]; MIN.: 5,78; MAX.: 28,9; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,14 (N. S.) 41
- ABB. 36:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER DSA AUF CD62, AKTIVIERT, ARTERIELL (N = 24); R = 0,19 (N. S.); WERTE VOR KM: [10,14]; MIN.: 5,57; MAX.: 37,52; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,03 (N. S.) 42
- ABB. 37:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER DSA AUF CD63, AKTIVIERT, ARTERIELL (N = 24); R = -0,06 (N. S.); WERTE VOR KM: [11,56]; MIN.: 5,57; MAX.: 29,43; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,03 (N. S.) 42
- ABB. 38:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER DSA AUF CD62, AKTIVIERT, VENÖS (N = 24); R = 0,42 (P = 0,04); WERTE VOR KM: [11,14]; MIN.: 5,14; MAX.: 37,52; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,04 (N. S.) 43
- ABB. 39:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER DSA AUF CD63, AKTIVIERT, VENÖS (N = 24); R = -0,07 (N. S.); WERTE VOR KM: [10,7]; MIN.: 5,78; MAX.: 28,9; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,04 (N. S.) 43
- ABB. 40:** EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER PTA AUF CD62, NATIV, ARTERIELL (N = 20); R = 0,71 (P = 0,001); WERTE VOR PTA: [4,43]; MIN.: 2,86; MAX.: 14,59; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,09 (N. S.) 44

-
- ABB. 41: EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER PTA AUF CD63, NATIV, ARTERIELL (N = 20); R = 0,56 (P = 0,01); WERTE VOR PTA: [5,6]; MIN.: 4,61; MAX.: 17; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,09 (N. S.) 45
- ABB. 42: EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER PTA AUF CD62, NATIV, VENÖS (N = 20); R = -0,08 (N. S.); WERTE VOR PTA: [4,07]; MIN.: 3,11; MAX.: 10,84; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,01 (N. S.) 45
- ABB. 43: EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER PTA AUF CD63, NATIV, VENÖS (N = 20); R = 0,01 (N. S.); WERTE VOR PTA: [5,5]; MIN.: 4,61; MAX.: 9,31; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,01 (N. S.) 46
- ABB. 44: EINFLUß DER DILATATION WÄHREND DER PTA AUF CD62, NATIV, ARTERIELL (N = 20); R = 0,49 (P = 0,03); WERTE VOR PTA: [4,43]; MIN.: 2,86; MAX.: 14,59; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,06 (N. S.) 47
- ABB. 45: EINFLUß DER DILATATION WÄHREND DER PTA AUF CD63, NATIV, ARTERIELL (N = 20); R = 0,5 (P = 0,02); WERTE VOR PTA: [5,6]; MIN.: 4,61; MAX.: 17; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,06 (N. S.) 47
- ABB. 46: EINFLUß DER DILATATION WÄHREND DER PTA AUF CD62, NATIV, VENÖS (N = 20); R = 0,02 (N. S.); WERTE VOR PTA: [4,07]; MIN.: 3,11; MAX.: 10,84; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,12 (N. S.) 48
- ABB. 47: EINFLUß DER DILATATION WÄHREND DER PTA AUF CD63, NATIV, VENÖS (N = 20); R = 0,2 (N. S.); WERTE VOR PTA: [5,5]; MIN.: 4,61; MAX.: 9,31; ISOTYPKONTROLLEN: R = 0,12 (N. S.) 48
- ABB. 48: EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER PTA AUF CD62, NATIV, ARTERIELL (N = 14); R = 0,21 (N. S.); WERTE VOR PTA: [4,43]; MIN.: 2,86; MAX.: 14,59; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,3 (N. S.) 49
- ABB. 49: EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER PTA AUF CD63, NATIV, ARTERIELL (N = 15); R = 0,37 (N. S.); WERTE VOR PTA: [5,6]; MIN.: 4,61; MAX.: 17; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,3 (N. S.) 50
- ABB. 50: EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER PTA AUF CD62, NATIV, VENÖS (N = 15); R = -0,57 (P = 0,03); WERTE VOR PTA: [4,07]; MIN.: 3,11; MAX.: 10,84; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,15 (N. S.) 50
- ABB. 51: EINFLUß DER KM-MENGE WÄHREND DER PTA AUF CD63, NATIV, VENÖS (N = 15); R = -0,31 (N. S.); WERTE VOR PTA: [5,5]; MIN.: 4,61; MAX.: 9,31; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,15 (N. S.) 51
- ABB. 52: EINFLUß DER DILATATION WÄHREND DER PTA AUF CD62, NATIV, ARTERIELL (N = 14); R = 0,13 (N. S.); WERTE VOR PTA: [4,43]; MIN.: 2,86; MAX.: 14,59; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,42 (N. S.) 51
- ABB. 53: EINFLUß DER DILATATION WÄHREND DER PTA AUF CD63, NATIV, ARTERIELL (N = 15); R = 0,19 (N. S.); WERTE VOR PTA: [5,6]; MIN.: 4,61; MAX.: 17; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,42 (N. S.) 52
- ABB. 54: EINFLUß DER DILATATION WÄHREND DER PTA AUF CD62, NATIV, VENÖS (N = 15); R = -0,29 (N. S.); WERTE VOR PTA: [4,07]; MIN.: 3,11; MAX.: 10,84; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,29 (N. S.) 52
- ABB. 55: EINFLUß DER DILATATION WÄHREND DER PTA AUF CD63, NATIV, VENÖS (N = 15); R = -0,3 (N. S.); WERTE VOR PTA: [5,5]; MIN.: 4,61; MAX.: 9,31; ISOTYPKONTROLLEN: R = -0,29 (N. S.) 53

1 Einleitung

1.1 PAVK

1.1.1 Definition

Die PAVK umfaßt stenosierende oder okkludierende Veränderungen der Aorta und der die Extremitäten versorgenden Arterien. Diese Veränderungen sind zu 95 % arteriosklerotisch bedingt und betreffen in ungefähr 90 % der Fälle die unteren Extremitäten. In etwa der Hälfte der Krankheitsfälle mit Durchblutungsstörungen der Beine liegt eine PAVK vom Oberschenkeltyp, in etwa 30 % vom Beckentyp und in 20 % vom peripheren Typ vor. Männer leiden an der PAVK bis zu fünfmal häufiger als Frauen. Von erheblicher klinischer Relevanz ist die Koinzidenz der PAVK mit zerebralen und kardialen Durchblutungsstörungen [19].

Die Existenz bestimmter Risikofaktoren begünstigt die Entwicklung einer PAVK: Zigarettenrauchen, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Hyperurikämie sind gesicherte, allgemein anerkannte Risikofaktoren [8, 19].

Ein wichtiges klinisches und für das Stadium II nach Fontaine charakteristisches Symptom der PAVK stellen belastungsabhängige Schmerzen dar. Bei Auftreten in den unteren Extremitäten werden sie als Claudicatio intermittens bezeichnet. Die Claudicatio intermittens macht sich nur bei Muskularbeit, jedoch nicht in Ruhe bemerkbar und ist durch eine meßbare Belastung, z. B. eine bestimmte Gehstrecke, reproduzierbar auszulösen. Im Stadium IIa nach Fontaine beträgt die schmerzfreie Gehstrecke über 200 Meter, im Stadium II b liegt sie darunter [8]. Beim weiteren Fortschreiten der PAVK kommt es zu Ruheschmerzen (Stadium III) und schließlich zu trophischen Läsionen (Stadium IV).

1.1.2 Diagnostik

Bei Patienten mit einer PAVK werden neben der Anamnese-Erhebung und der klinischen Untersuchung zunächst nichtinvasive apparative Untersuchungstechniken (z. B. Duplexsonographie, Dopplerdruckmessung der Knöchelarterien, Bestimmung des brachiopedalen Druckgradienten, continuous-wave-Doppler der peripheren Gefäße und im Stadium II nach Fontaine Laufbandergometrie) angewendet [8]. Zur genauen Beurteilung von Gefäßstenosen bzw. -verschlüssen und weiteren invasiven Therapieplanung kommt am häufigsten die intraarterielle DSA der Aorta und der Becken- und Beinarterien zum Einsatz. Dabei wird nach perkutaner Punktion der Arteria femoralis communis in Seldinger-Technik über eine retrograd platzierte Schleuse ein Katheter in die Aorta abdominalis vorgeschoben, KM unter hohen Drücken eingespritzt und eine Serie von Röntgenbildern mit digitaler Bildverstärker-Fernseh-Technik erstellt und nachbearbeitet [87].

1.1.3 Therapie

Neben der Minimierung bzw. Ausschaltung der wichtigsten Risikofaktoren gehören im Stadium IIb - IV nach Fontaine die Pharmakotherapie sowie lumeneröffnende Maßnahmen zu den allgemeinen Behandlungsprinzipien der PAVK [19]. In Abhängigkeit von der Klinik und der Lokalisation der Stenosen bzw. Verschlüsse hat sich als Methode der ersten Wahl zur Lumeneröffnung die PTA durchgesetzt, welche auf der Grundlage der Pionierarbeiten von Dotter, Grüntzig, Schneider und Wierny entwickelt wurde [8, 66]. Bei der PTA wird in der Regel ebenfalls die Arteria femoralis communis punktiert, dann eine Schleuse platziert und Heparin bis zu einer Menge von 10000 I. E. injiziert. Mittels eines Führungsdrahtes erfolgt die Überwindung der Stenose oder des Verschlusses. Nach Überprüfung der korrekten Lage des Drahtes unter angiographischer Durchleuchtungskontrolle läßt sich ein Ballon-Katheter in evakuiertem Zustand in die zuvor markierte stenosierte oder verschlossene Stelle des Gefäßes einführen. Durch Füllung des Ballons wirken Drücke bis zu 10^6 Pa, und das arteriosklerotische Verschlußmaterial wird infolge mehrmaliger Dilatationen in die Gefäßwand gepreßt. Unter Durchleuchtung mit KM ist es möglich, den Erfolg jeder Dilatationsserie zu kontrollieren. Zur Dokumentation der Ergebnisse werden im Anschluß an die PTA Kontrollangiogramme in DSA-Technik angefertigt [52].

Somit stellt die Angioplastie eine „kontrollierte Verletzung“ der Gefäßwand dar. Dabei treten radiäre Einrisse in den arteriosklerotischen Plaques und der normalen Intima auf, und es kommt zu einer Überdehnung der Media. Die Überstreckung der Muskelfibrillen resultiert in einer permanenten örtlichen Ekstasie. Die Dehiszenz zwischen steifer Plaque und elastischer Media wird als Dissektion bezeichnet und in ungefähr 50 % der Fälle auf Kontrollangiogrammen beobachtet. Der Heilungsprozeß ist nach ca. sechs Wochen abgeschlossen [31].

1.2 Bedeutung der Thrombozyten

1.2.1 Pathogenese der Arteriosklerose

Unter den verschiedenen Hypothesen zur Pathogenese der Arteriosklerose sind die „Klon-Wachstums“-Theorie und die „Inkrustations“- sowie die „response-to-injury“-Hypothese am anerkanntesten [8]. Eine Endothelläsion kann den initialen Faktor arteriosklerotischer Umbauvorgänge darstellen. Vermutliche Auslöser sind erhöhte Serumcholesterinspiegel, Strömungsabnormalitäten und chemische Reize wie Kohlenmonoxid. Die Endothelverletzung führt neben einer Thrombozytenanhaftung und lokalen Aktivierung des Gerinnungssystems zu einer Stimulation und Proliferation von Myozyten. PDGF wird von Endothelien, Thrombozyten, Myozyten und anderen Zellen freigesetzt, induziert eine unmittelbare Aktivierung und Aggregation weiterer Plättchen und fördert die Formation fibröser Plaques. Unter ungünstigen Bedingungen entwickelt sich in den Plaques infolge Sauerstoffmangels eine zentrale Nekrose, in deren Nachbarschaft sich Kalksalze ablagern. In fortgeschrittenen Stadien können die Plaques einreißen, so daß arte-

riosklerotische Läsionen entstehen, die dann von einem Thrombus abgedeckt werden. Verdickungen der Arterienwand durch Intimaödeme, die Proliferation glatter Muskelzellen und intraluminäre Thromben sind in der Lage, ein Gefäß bis zum völligen Verschluß einzuengen [19, 37].

Es liegen Hinweise dafür vor, daß eine lokale Anlagerung von Thrombozyten auch an Gefäßwände mit strukturell intaktem, jedoch funktionell geschädigtem Endothel möglich ist, welches Adhäsionsmoleküle wie PECAM expremiert und nur unzureichende Mengen an EDRF freisetzt [68]. Weiterhin können Plättchen mittels Zytokinen wie CD154 und IL-1 auf direktem Weg lokale entzündliche Reaktionen der Gefäßwand auslösen und arteriosklerotische Veränderungen beschleunigen [32, 51].

1.2.2 Aktivierung der Thrombozyten

Sowohl in der Pathogenese der PAVK als auch infolge einer Angioplastie werden arteriosklerotische Plaques eingerissen und subendotheliale Strukturen freigelegt. Diese Strukturen führen besonders in stenotisierten Gefäßregionen mit verringertem Blutfluß aufgrund ihrer hochgradig thrombogenen Eigenschaften zu einer starken Anlagerung und Aktivierung von Thrombozyten [7, 12]. Gleichzeitig wird an der verletzten Stelle durch die Aktivierung des ex- und intrinsischen Gerinnungssystems Thrombin gebildet, welches einen starken Agonisten für die Plättchenaktivierung und einen mitogenen Faktor für verschiedene Zellen darstellt. Nach einer Läsion endothelialer Strukturen laufen folgende Prozesse ab [71]:

1. Adhäsion nichtaktivierter Plättchen an subendotheliale zytoadhäsive Proteine (Kollagen, vWF, Fibronectin, Laminin, Thrombospondin und Vitronectin)

Der Oberflächen-Rezeptor GPIb-IX, ein Mitglied der LRG (Leuzinreiche GP) - Genfamilie der Thrombozyten, ist verantwortlich für die Adhäsion nichtaktivierter Plättchen an den vWF des Subendothels und für die indirekte Bindung von Thrombozyten an Kollagen [15, 85]. Außerdem besitzt dieser Rezeptor Bindungsstellen für Thrombin und könnte aufgrund dessen eine Bedeutung für die Aktivierung zirkulierender Plättchen haben [61, 71]. GPIb-IX ist thrombozytenspezifisch und daher für eine Markierung von Plättchen durch Antikörper gegen GPIb geeignet [1]. GPIb wird während der Aktivierung der Thrombozyten downreguliert [54] und spielt eine wichtige Rolle für die Aggregation von Plättchen, wenn sie hohen Schergeschwindigkeiten ausgesetzt sind [15]. Die Bindung von GPIb an vWF bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors GPIIb/IIIa, welcher dadurch, aber auch durch den Kontakt mit Liganden und im Rahmen der Aktivierung seine funktionelle Form annehmen kann [86]. GPIIb/IIIa, ein kalziumabhängiger Rezeptor der Thrombozyten, gehört zur Genfamilie der Integrine und ist nach seiner Konformationsänderung in der Lage, Proteine wie Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Vitronectin zu binden [15, 49]. Andere am Prozeß der Adhäsion beteiligte Integrine der Thrombozyten sind der Fibronectin-Rezeptor GPIc/IIa, der Vitronectin-Rezeptor und GPIV, der keiner Genfamilie zugeordnet werden kann und vermutlich einen Thrombospondin-Rezeptor verkörpert [15]. Der Integrin-Rezeptor $\alpha_2\beta_1$ bindet im aktivier-

ten Zustand spezifisch an lösliches Kollagen, einen anderen Kollagen-Rezeptor stellt wahrscheinlich GPVI dar [38, 85].

2. Aktivierung adhäsiver Thrombozyten, welche proaggregatorische Substanzen wie ADP und Thromboxan A₂ freisetzen

Nach der Anlagerung an Kollagen ändern die Thrombozyten ihre normale diskoidale Gestalt, indem sie in eine sphärische Form übergehen. Dieser Prozeß wird durch Kontraktionen von Mikrofilamenten verursacht und beinhaltet wahrscheinlich auch eine Änderung in der Anordnung eines peripheren Bandes von Mikrotubuli. Dem Zusammenbau und der Interaktion von Aktinfilamenten folgt eine Ausbildung dendritischer pseudopodienartiger Zellausläufer, wodurch die Plättchen zum Ausbreiten (spreading) befähigt werden [15].

Die Kontraktion forciert den Ablauf der Sekretion, welche einen exozytotischen Vorgang beschreibt, bei dem in Granula gespeicherte Produkte in das den Thrombozyten umgebende extrazelluläre Milieu gelangen. Plättchen besitzen drei Arten von Speichergranula: α -Granula, Lysosomen und die dichten δ -Granula. In den α -Granula sind Gerinnungsfaktoren, thrombozytenspezifische Proteine, Wachstumsfaktoren (PDGF) und GP (Thrombospondin, Fibronektin) enthalten, die Lysosomen speichern hydrolytische Enzyme und die δ -Granula energiereiche Phosphate, Kationen sowie Serotonin. Im Rahmen der Exozytose verschmelzen die Membranen der Granula und Lysosomen mit der Plasmamembran der Thrombozyten, entleeren ihren Inhalt in den extrazellulären Raum und präsentieren neue spezifische Epitope auf der Oberfläche der Plättchen. Zu diesen Epitopen gehören die GP P-Selectin und LIMP-CD63, welche aufgrund ihrer stimulierungsabhängigen Expression hervorragende Marker für die Aktivierung von Thrombozyten bei flußzytometrischen Messungen der extrinsischen Zellfluoreszenz darstellen [15].

P-Selectin, auch PADGEM, GMP-140 und CD62 genannt, gehört zur Genfamilie der Selektine und befindet sich bei ruhenden Plättchen in der Membran der α -Granula, konnte aber auch in Membranen der δ -Granula, in den Palade-Weibel-Körperchen von Endothelzellen und in Zellen lymphatischer Gewebe nachgewiesen werden [53, 61]. Die biologische Funktion dieses GP beruht wahrscheinlich auf seiner Eigenschaft, eine Bindung mit Leukozyten einzugehen, sie zu aktivieren und Zell-Zell-Interaktionen zu ermöglichen, die auch für die Pathogenese der Arteriosklerose von Bedeutung sein könnten [62, 79].

Das GP LIMP-CD63 ist in der Membran der thrombozytären Lysosomen lokalisiert und scheint identisch mit ME491, einem Melanom-assoziierten Antigen, zu sein. Außerdem wurde seine Analogie mit einem neuroglandulären Antigen und mit Granulophysin, welches sich in den δ -Granula der Plättchen befindet, nachgewiesen [60]. Weiterhin wird LIMP-CD63 von Granulozyten und Makrophagen sowie von lymphatischen Zellen expremiert [53]. Seine biologische Funktion ist noch nicht geklärt. Man vermutet, daß eine stark glykolysierte Domäne dieses Moleküls die Membranen der Granula in den Zellen vor enzymatischer Verdauung schützt [28].

3. Thrombinproduktion

Infolge der Aktivierung des ex- und intrinsischen plasmatischen Blutgerinnungssystems entsteht durch Komplexbildung der Prothrombinaktivator, welcher Prothrombin in Thrombin umwandelt. Thrombin stellt wie auch Kollagen und Trypsin einen starken Agonisten für die Plättchenaktivierung dar, forciert die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen über den Rezeptor GPIIb/IIIa und kann die Sekretion aller drei Arten von Speichergranula auslösen. Im Gegensatz dazu sind mäßige (Thromboxan A₂) und schwache Agonisten (ADP, Epinephrin, Vasopressin, Serotonin und PAF) nur zum Triggern der Sekretion von α - und δ -Granula befähigt [15, 47].

4. Aktivierung weiterer Plättchen in der Umgebung der Läsion (durch Thrombin, ADP und Thromboxan A₂), welche daraufhin Rezeptoren für Adhäsionsmoleküle exponieren

Die Freisetzung gespeicherter Produkte (vor allem ADP, Serotonin und Fibrinogen) aus Thrombozytengranula im Rahmen der Sekretion geht einher mit Änderungen der rheologischen Eigenschaften des Blutes in unmittelbarer Umgebung der Gefäßverletzung. Beide Prozesse führen zu einer Kollision nicht aktivierter mit aktivierten Thrombozyten und schaffen die Voraussetzungen für einen engen Kontakt zwischen den Zellen sowie die Formation von Plättchenaggregaten [15].

5. Akkumulation von Thrombozyten durch Plättchen-Ligand-Interaktionen

Hier steht neben anderen zytoadhäsiven Proteinen die Bindung von Fibrinogen und vWF an den Rezeptor GPIIb/IIIa an erster Stelle. Im Ergebnis dieser Bindung werden „Proteinbrücken“ zwischen Thrombozyten ausgebildet, die auf diese Weise immer mehr vernetzten und Aggregate ausbilden [61].

6. Stabilisierung des Plättchenthrombus durch Thrombin-katalysierte Fibrin-Formation

Die Prozesse Adhäsion, Kontraktion, Sekretion und Aggregation stellen die fundamentalen Mechanismen der Thrombozytenaktivierung dar und können relativ unabhängig voneinander ablaufen. Die Anzahl involvierter Plättchen, das Ausmaß ihrer individuellen Reaktion und die Menge der freigesetzten Sekrete sind abhängig von der Art und der Intensität des aktivierenden Stimulus und der Sensibilität der Thrombozytenpopulation [15].

1.2.3 Klinische Relevanz

Die Thrombozyten haben eine zentrale Bedeutung für die Pathogenese der PAVK. Weiterhin werden sie bei Patienten mit instabiler Angina pectoris, Myokardinfarkt und transitorischen ischämischen Attacken sowie nach angioplastischen und operativen Eingriffen als Verursacher okklusiver vaskulärer Komplikationen in Betracht gezogen [67, 78]:

Es wurde nachgewiesen, daß eine starke Expression von P-Selectin auf die Aktivierung von Thrombozyten schließen läßt und einen Indikator für das Risiko akuter kardialer Komplikationen bei Patienten mit KHK darstellt [37]. Die Aktivierung von Plättchen durch eine lokale Schädigung von Gefäßen oder eine akute hämodynamische Störung ist das auslösende Ereignis für eine Okklusion von Koronararterien, in deren Folge sich ein Myokardinfarkt entwickelt. Es zeigte sich, daß Patienten nach einem Myokardinfarkt eine erhöhte Relativzahl zirkulierender aktivierter Thrombozyten mit einem vergrößerten Volumen und einer verstärkten Expression von LIMP-CD63 aufweisen [24, 74]. Außerdem führen PTCA [24, 71] und Bypass-Operationen [5, 58] zu einer Aktivierung zirkulierender Thrombozyten. Prospektive Studien erbrachten den Beweis, daß die Expression von P-Selectin und LIMP-CD63 Informationen für die Vorhersage okklusiver vaskulärer Ereignisse nach einer Angioplastie von Koronargefäßen liefert [83, 36].

Für die Entstehung von Reokklusionen dilatierter Gefäße nach einer PTA werden wandständige Thromben sowie von Plättchen freigesetzte Wachstumsfaktoren (z. B. PDGF) verantwortlich gemacht. Die Formation der Thromben ist auf eine Anlagerung aktivierter Thrombozyten zurückzuführen, thrombozytäre Wachstumsfaktoren infiltrieren die Gefäßwände und induzieren eine Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in der Media [56].

2 Fragestellung

Viele Studien konnten den Nachweis erbringen, daß bestimmte Krankheiten mit einer vermehrten Anzahl aktivierter Thrombozyten assoziiert sind und daß interventionelle Eingriffe an Patienten eine Aktivierung von Plättchen zur Folge haben. Besonders intensiv wurden hierbei die KHK sowie die Koronarangiographie und die PTCA untersucht.

Unsere Studie ging der Frage nach, ob ein Zusammenhang zwischen der PAVK und der Aktivierung zirkulierender Plättchen besteht und ob die intraarterielle DSA sowie die PTA im Bereich der unteren Extremitäten die Aktivierung zirkulierender Thrombozyten beeinflussen. Folgende Schritte sollten die Beantwortung der Frage ermöglichen:

1. Der Vergleich zwischen einer Kontrollgruppe von PAVK-Patienten (KG1) ohne interventionelle Manipulationen mit gesunden Probanden (KG2) sollte überprüfen, ob Patienten mit PAVK eine höhere Anzahl aktivierter Plättchen aufweisen als Probanden ohne diese Krankheit. Dabei wurden Blutproben jeweils mit einer Kanüle aus der Cubitalvene entnommen.
2. Einer Stichprobe von PAVK-Patienten (Gruppe PTA) wurden vor, direkt nach PTA und 4 Stunden später in der femoropoplitealen Region Blutproben aus arteriellen und venösen Schleusen entnommen. Die Meßwerte der Proben verschiedener Abnahmezeitpunkte wurden miteinander verglichen, um Aussagen über die Auswirkung der Angioplastie auf die Aktivierung der Thrombozyten treffen zu können.
3. Wahrscheinlich wirkte sich auch das während der PTA applizierte KM auf die Meßergebnisse aus [89]. Um den Einfluß des KM separat betrachten zu können, wendeten wir die gleiche Methode der Abnahme, Messung und Auswertung wie bei der Gruppe PTA auch bei einer Stichprobe von PAVK-Patienten (Gruppe KM) an, die einer intraarteriellen DSA der Aorta und der Becken- und Beinarterien unterzogen wurden.
4. Ein Vergleich der Gruppe KG1 mit den Gruppen PTA und KM sollte die Abhängigkeit der Meßergebnisse von der Abnahmemethode untersuchen.
5. Eine in-vitro-Aktivierung aller entnommenen Blutproben sollte zusätzliche Informationen über die Sensibilität der Plättchen gegenüber exogener Aktivierung bereitstellen.
6. Um eine eventuelle Aktivierung von Thrombozyten im intervenierten Gefäßabschnitt bzw. ihre Anlagerung an Gefäßstrukturen oder andere Blutzellen nachzuweisen, führten wir einen Vergleich zwischen den Blutproben aus dem arteriellen und venösen Bereich durch.
7. Schließlich interessierte uns die Abhängigkeit der Meßwerte von quantitativen Änderungen der Interventionsbedingungen und die klinische Bedeutung unserer Ergebnisse.

3 Patienten und Methoden

3.1 Zusammensetzung der Gruppen

Zur Studie gehörten 5 Patientengruppen:

1. Die Kontrollgruppe „KG1“ schloß 16 stationäre Patienten mit einer PAVK ein, denen wir Blut aus der Cubitalvene entnahmen. An ihnen ließ sich die Thrombozytenaktivierung ohne den Einfluß des Fremdkörperkontaktes durch die Schleusen studieren, welche immer bei der PTA und der intraarteriellen DSA zum Einsatz kamen. Keiner dieser Patienten wurde während einer späteren Intervention untersucht.
2. Die Kontrollgruppe „KG2“ umfaßte 25 Probanden. Sie rekrutierten sich aus Patienten einer Station für gastrointestinale Erkrankungen und einer orthopädischen Station der Charité. Kein Patient litt an Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Arteriosklerose, KHK und Lebererkrankungen. Außerdem wurde darauf geachtet, daß operative Eingriffe länger als zwei Wochen zurücklagen. Die arterielle Hypertonie war kein Ausschlußkriterium für die Zusammenstellung der Gruppe KG2, da bei hypertonen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden keine relevante Aktivierung von Thrombozyten beobachtet wurde [3]. Die Durchführung der Blutabnahmen vollzogen wir unter denselben Bedingungen wie bei der Gruppe KG1. Hier untersuchten wir die Thrombozytenaktivierung an Probanden mit gesunden Gefäßen unter Ausschluß wichtiger Risikofaktoren für die PAVK.
3. Die Gruppe „KM“ setzte sich aus 24 PAVK-Patienten zusammen, bei denen eine intraarterielle DSA der Bauchaorta und der Arterien im Bereich des Beckens und beider Beine durchgeführt wurde. Die Meßergebnisse der Thrombozytenaktivierung dieser Patienten stammten von Blutentnahmen vor, direkt nach und 4 Stunden nach der DSA und waren in erster Linie vom Einfluß der Gefäß-Punktionen, des Heparins, des KM und des Fremdkörpermaterials der Schleusen abhängig.
4. Die Gruppe „PTA“ beinhaltete 22 PAVK-Patienten, welche einer PTA von iliacalen bzw. femoropoplitealen Arterien unterzogen wurden. Die Abnahmebedingungen entsprachen denen der Gruppe „KM“. Ein zusätzlicher Einfluß auf die Meßergebnisse der Thrombozytenaktivierung bestand in der Dilatation von Gefäßwänden sowie in der Anwendung höherer Heparin- und geringerer KM-Mengen im Vergleich zur intraarteriellen DSA.

5. In die Gruppe „KM und PTA“ wurden 10 Patienten mit PAVK eingeschlossen, bei denen wir jeweils die Folgen sowohl einer intraarteriellen DSA der Bauchaorta und der Becken- und Beinarterien als auch einer wenige Tage später durchgeführten PTA untersuchten. Diese 10 Patienten stammten aus der Gruppe „KM“ bzw. „PTA“ und sind mathematisch als zusammengefaßte Teilmengen dieser Gruppen aufzufassen.

Somit gab es 14 Patienten, an denen wir die Thrombozytenaktivierung nur während einer intraarteriellen DSA beobachteten, und 12 Patienten, die wir nur während einer PTA untersuchten. Alle Patienten mit einer PAVK befanden sich im Stadium II nach Fontaine.

Unter Ausnutzung der Meßergebnisse, die von entnommenen Blutproben dieser 5 Patientengruppen gewonnen wurden, war es uns möglich, Einflüsse durch die Abnahmemethode, eine vorbestehende PAVK und durch unterschiedliche Interventionsbedingungen auf die Thrombozytenaktivierung zu analysieren.

3.2 Eigenschaften der Gruppen

Die anamnestischen und paraklinischen Daten (siehe Tabelle 1) veranschaulichen, daß alle Gruppen mit PAVK eine einheitliche Altersverteilung aufwiesen, die Gruppe KG2 war im Durchschnitt um 7 Jahre jünger. Insgesamt waren weniger Frauen als Männer vertreten, was der normalen Verteilung der Geschlechter auf einer angiologischen Station entspricht.

Fast alle Patienten mit einer PAVK befanden sich im Stadium IIb nach Fontaine und wurden, außer bei Kontraindikationen, mit ASS behandelt. Das Rauchen war der häufigste aus der Anamnese entnommene Risikofaktor für eine PAVK in den betroffenen Gruppen. Hier ist anzumerken, daß alle untersuchten Patientinnen mit diesem Krankheitsbild langjährig geraucht hatten. Den zweithäufigsten anamnestischen Risikofaktor stellte die arterielle Hypertonie dar. Es folgten Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie, Diabetes mellitus und Hyperurikämie. Adipositas, deren Therapie in der Sekundärprophylaxe der PAVK eine Bedeutung zukommt [19], trat in den PAVK-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe „KG2“ nur geringfügig vermehrt auf.

In der Gruppe KM wurden bei 15 Patienten (63 %) femoropopliteale, bei 2 Patienten (8 %) iliaceale und bei 7 Patienten (29 %) sowohl femoropopliteale als auch iliaceale Stenosen bzw. Verschlüsse diagnostiziert. In der Gruppe PTA wurden nach antegrader Punktion der Arteria femoralis communis Stenosen (singulär, kalzifizierend, konzentrisch, unter 10 cm Länge) der Arteria femoralis superficialis dilatiert.

	KG1 (n = 16)	KG2 (n = 25)	KM (n = 24)	PTA (n = 22)	KM + PTA (n = 10)
Alter (arithm. Mittel in Jahren)	60 ± 11	53 ± 15	61 ± 9	60 ± 9	60 ± 10
Frauen (n)	2 (12 %)	12 (48 %)	6 (25 %)	5 (23 %)	2 (20 %)
PAVK IIb (n)	12 (75 %)	0	17 (71 %)	19 (86 %)	8 (80 %)
Raucher (n)	13 (81 %)	6 (24 %)	19 (79 %)	13 (59 %)	6 (60 %)
art. Hypertonie (n; > 140/90 mmHg)	8 (50 %)	7 (28 %)	15 (62 %)	12 (54 %)	4 (40 %)
Hypercholesterinämie (n; > 7,67 mmol/l)	4 (25 %)	0	11 (46 %)	12 (54 %)	5 (50 %)
Hypertriglyzeridämie (n; > 1,7 mmol/l)	3 (19 %)	1 (4 %)	5 (21 %)	8 (36 %)	3 (30 %)
Diabetes mellitus IIb (n)	3 (19 %)	0	5 (21 %)	2 (9 %)	1 (10 %)
Hyperurikämie (n; > 400 µmol/l)	2 (12 %)	1 (4 %)	2 (8 %)	1 (5 %)	0
Adipositas (n; BMI > 30)	4 (25 %)	7 (28 %)	9 (38 %)	5 (23 %)	4 (40 %)
ASS (300 mg/d) (n)	11 (69 %)	1 (4 %)	20 (83 %)	18 (82 %)	7 (70 %)

Tabelle 1 **Daten aus Anamnese und Paraklinik** (Häufigkeit des Auftretens und prozentualer Anteil der Merkmale in den Gruppen, bei der Variablen „Alter“ arithm. Mittel mit Standardabweichung)

Die Gruppen mit PAVK, die einer Intervention unterzogen wurden, differierten stark in den KM- und Heparinmengen (siehe Tabelle 2). Die Ursache dafür liegt in den Unterschieden zwischen den Eingriffen intraarterielle DSA und PTA begründet: Während einer DSA wird mehr KM benötigt und seltener Heparin appliziert als bei einer PTA.

	KG1 (n = 16)	KG2 (n = 25)	KM (n = 24)	PTA (n = 22)	KM + PTA (n = 10)
KM-Menge (ml)	0	0	123 ± 39	66 ± 43	KM: 108 ± 32 PTA: 67 ± 42
Heparinmenge (I. E.)	0	0	2100 ± 1700	9000 ± 1300	KM: 2000 ± 1200 PTA: 8800 ± 1200
Dilatationsdauer (min)	0	0	0	10 ± 6	KM: 0 PTA: 11 ± 6

Tabelle 2 **Interventionseinflüsse in den Gruppen** (arithm. Mittel und Standardabweichungen)

3.3 Methode der Blutentnahme und Aufbereitung der Proben

Wie bereits unter 1.2.2 ausgeführt, eignen sich CD62 und LIMP-CD63 hervorragend als Marker für die Aktivierung zirkulierender Thrombozyten bei flußzytometrischen Messungen der extrinsischen Zellfluoreszenz.

Ziel des Abnahme- und Aufbereitungsverfahrens in dieser Studie war die möglichst artefaktfreie Herstellung von stabilen sowie für den Ort und Zeitpunkt der Thrombozytenaktivierung repräsentativen Vollblutproben der zu untersuchenden Probanden. Für flußzytometrische Messungen wurden diese Proben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD62, CD63 und andere thrombozytäre Antigene gefärbt.

3.3.1 Abnahme der Proben

Während der intraarteriellen DSA und PTA fand die erste Blutabnahme jeweils aus der arteriellen und der venösen Schleuse statt, unmittelbar nachdem sie in das Gefäß eingeführt worden waren. Erst danach begannen weitere interventionelle Maßnahmen am Patienten (z. B. Einführen von Kathetern und Drähten, Heparin- und KM-Applikationen, Dilatationen). Direkt nach Beendigung der Eingriffe und Entfernung der DSA- bzw. PTA-Bestecke aus den Gefäßen erfolgte die zweite Blutabnahme aus den Schleusen. Diese verblieben für 4 Stunden in den Gefäßen. Danach vollzogen wir die dritte Blutabnahme am Bett des Patienten in analoger Weise.

Das Blut der Kontrollprobanden wurde nach Anlage einer Oberarmstaubinde und leichter Stauung mit Hilfe einer Venenpunktionskanüle (0,8 x 38 mm; 21G) aus der Cubitalvene entnommen. Bei allen Abnahmen strömte das Blut unter sterilen Bedingungen und mit leichter Aspiration langsam in 5ml-EDTA-Monovetten.

3.3.2 Aufbereitung der Proben

3.3.2.1 Verwendete Antikörper und Chemikalien

1. Tetrapeptid Gly-Pro-Arg-Pro von Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
2. Thromboxan A₂- Analogon U46619 von Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
3. Monoklonale Antikörper von Immunotech (Marseille, Frankreich):
 - isotypische Maus-IgG1-Kontroll-Antikörper, FITC-markiert, Klon: 679.1Mc7
 - Anti-CD42b(GPIIb)-IgG1 (Maus), R-Phycoerythrin-markiert, Klon: SZ2
 - Anti-CD62P(P-Selectin)-IgG1 (Maus), FITC-markiert, Klon: CLBThromb/6
 - Anti-CD63(LIMP-CD63)-IgG1 (Maus), FITC-markiert, Klon: CLBGran/12
4. Phosphatpuffer (1000 ml enthielten: 8,182 g Natriumchlorid, 1,78 g Di-Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat)
5. Das Stabilisierungsmittel CyFixII wurde freundlicherweise von Dr. med. A. Ruf (Institut für Medizinische Labordiagnostik, Klinikum Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Es enthielt 0,15 M Phosphatpuffer (pH-Wert: 7,4) mit Glyoxal 0,2 % (v/v) und Formaldehyd 0,4 % (w/v) [70].

3.3.2.2 Fixierung der nativen Thrombozyten

Die Fixierung der nativen Thrombozyten fand unmittelbar nach der Blutabnahme statt. Dazu wurde die EDTA-Monovette leicht geschwenkt und 50 µl pipettierten Blutes im Verhältnis 1 : 2 zu dem Stabilisierungsmittel CyFixII in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und gemischt. Nach 10 min Inkubationszeit bei

Raumtemperatur erfolgte eine Verdünnung von 50 µl dieses Gemisches mit Phosphatpuffer im Verhältnis 1 : 20. Auf solche Art behandelte Blutproben sind für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur lagerungsstabil [70]. Es war deshalb nicht nötig, unverzüglich mit ihrer weiteren Aufbereitung zu beginnen. Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer unkontrollierten in-vitro-Aktivierung der Thrombozyten zu reduzieren, modifizierten wir in Absprache mit den Autoren die unter [70] angegebene Methode und verzichteten auf Waschschrte. Durch die sehr schnell vollzogene Fixierung der Plättchen mit Konstanthaltung ihrer Aktivierungs-Oberflächen-Antigene bestand damit die Möglichkeit, den zum Abnahmezeitpunkt bestehenden Status der Thrombozytenaktivierung nahezu unverändert nachzuweisen [70].

3.3.2.3 In-vitro-Aktivierung und Fixierung der Thrombozyten

Um Aussagen über die Aktivierbarkeit und somit die Sensibilität der Thrombozyten gegenüber Aktivierungsreizen treffen zu können, wurde das Blut jeder entnommenen Probe nicht nur nativ untersucht, sondern zusätzlich mit dem Thromboxan A₂- Analogon U46619 aktiviert, dessen Endkonzentration 10 µmol/l betrug [67, 70].

Eine Fehlerquelle bei der Messung aktivierter Thrombozyten stellt die Herausbildung größerer Thrombozytenaggregate dar: Aufgrund der Bindung von Fibrinogen und anderer zytoadhäsiver Proteine an die Fibrinogen-Rezeptoren (GPIIb/IIIa) aktivierter Plättchen erfolgt im Zusammenhang mit der Fibrin-Formation eine Vernetzung von Thrombozyten durch „Proteinbrücken“.

Diesen Prozeß konnten wir durch den Zusatz des Tetrapeptides Gly-Pro-Arg-Pro, das an Fibrinogen bindet und die Polymerisation von Fibrin-Monomeren inhibiert, blockieren. Gly-Pro-Arg-Pro unterdrückt die Entstehung von Aggregaten wirkungsvoll und hat keinen Einfluß auf die Bindung aktivierungsspezifischer Antikörper an Thrombozyten. Außerdem verhält es sich stabil gegenüber proteolytischen Einflüssen und beeinträchtigt die Thrombinaktivität nicht [46, 54].

In einem Eppendorf-Gefäß wurden 45 µl pipettierten EDTA-Blutes mit 45 µl Gly-Pro-Arg-Pro (5 mmol/l) versetzt, bevor die Zugabe von 10 µl U46619 (10^{-4} mol/l) erfolgte [70]. Dieser Cocktail verblieb nach guter Durchmischung für 10 Minuten in einem Inkubatorschrank bei 37 °C. Die anschließende Fixierung führten wir in gleicher Weise wie bei den nativen Proben durch.

3.3.2.4 Immunmarkierung der Thrombozyten

Von jedem Abnahmezeitpunkt eines Patienten wurden aus dem arteriellen (nicht bei den Kontrollgruppen) und aus dem venösen Bereich jeweils drei in dieser Art aufbereitete native und aktivierte Blutproben hergestellt. Diese drei Proben gehörten zu einem Set. Stets färbten wir die erste der drei Proben als isotypische Negativkontrolle mit FITC-markierten unspezifischen Maus-IgG1-Antikörpern, die zweite mit FITC-markierten Maus-IgG1-Antikörpern gegen P-Selectin (CD62) und die dritte mit FITC-markierten Maus-IgG1-Antikörpern gegen LIMP-CD63. Die Färbung bestand in der Zugabe von 5 µl eines FITC-

markierten Antikörpers zu 45 µl der in ein Mikrotiter Röhrchen pipettierten Blutprobe. Aus Vorversuchen ging hervor, daß wir damit sättigende Konzentrationen der Antikörper erreichten. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur und dunkler Umgebung führten wir die Endverdünnung der Probe, die anschließend für die flußzytometrische Messung bereitstand, mit 450 µl Phosphatpuffer durch.

3.4 Meßmethode

3.4.1 Aufbau und Funktionsweise des Meßgerätes

Die vorbereiteten Blutproben wurden mit einem FACSort-Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen.

Die Durchflußzytometrie dient der Erfassung physikalischer und chemischer Eigenschaften von Zellen, welche sich in einer Suspension befinden, während sie durch eine Meßregion fließen. Sie ermöglicht es, in einer Vollblutprobe quantitative multiparametrische Bestimmungen der Merkmale mehrerer Tausend Zellen pro Sekunde durchzuführen. Außerdem können anhand der Meßdaten ausgewählte Subpopulationen der Zellen physikalisch voneinander getrennt werden [88].

Das Durchflußzytometer besteht aus einem Versorgungsteil mit Netzteilen, Vorrats- und Abfallbehältern, einem Analysenteil mit Probenansaugvorrichtung, Durchflußzelle, Laserlichtquelle, Sammeloptiken, Lichtverstärkern und Sortiergerät sowie einer Auswerteinheit, die einen Hewlett-Packard-Computer mit dem Softwareprogramm „Lysis II“ umfaßt:

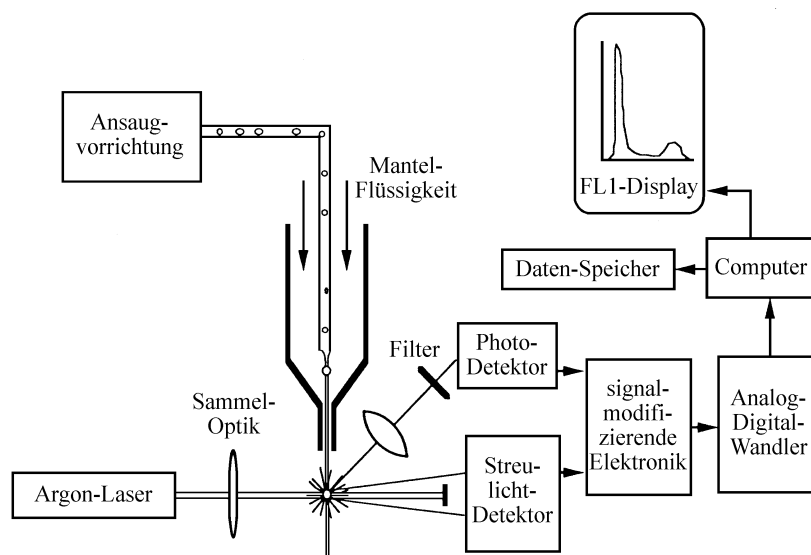


Abb. 1: schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflußzytometers (verändert nach [88])

Das Durchflußzytometer saugt die Blutproben während der Messung an und führt sie in einem kontinuierlichen Strom der Durchflußkammer zu. Dort werden die Blutzellen hydrodynamisch fokussiert, das heißt mit Hilfe einer Mantelflüssigkeit zentral ausgerichtet. Anschließend erreichen sie eine Enge, in der die Geschwindigkeit des laminaren Stromes sehr stark ansteigt [21]. In dieser Enge kreuzt jede Blutzelle einzeln einen gebündelten und elliptisch geformten Argon-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm.

Der Laser arbeitet nach dem Prinzip der angeregten Emission. Tritt eine mit FITC bzw. R-Phycoerythrin markierten Antikörpern beladene Zelle in den Laserstrahl ein, so werden diese Farbstoffe angeregt und strahlen ein Emissionsspektrum mit einem Maximum der relativen Fluoreszenz bei 517 nm (FITC) bzw. 578 nm (R-Phycoerythrin) aus. Damit sind die Emissionsmaxima deutlich voneinander zu unterscheiden und können von entsprechenden Detektoren erfaßt werden. Das Absorptionsspektrum von FITC weist ein Maximum bei 494 nm, das von R-Phycoerythrin ein Maximum bei 565 nm auf und ermöglicht jeweils eine effiziente Anregung durch den Argon-Laserstrahl [16]. Sammeloptiken fangen das emittierte Licht auf und führen es Lichtverstärkern zu, die ein elektrisches Signal, welches der Fluoreszenzintensität und dem jeweiligen zellulären Parameter proportional ist, zur Auswerteinheit weiterleiten.

Zusätzlich ist der FACSORT in der Lage, physikalische Eigenschaften der Zellen anhand des von ihnen gestreuten Lichts zu analysieren. Je nach Anordnung der Streulichtdetektoren unterscheidet man zwischen FSC und SSC.

Der Detektor für FSC befindet sich in einem kleinen Winkel (0,5 - 15°) zur Richtung des Laserstrahls. Mit FSC konnten wir im wesentlichen Aussagen über die Zellgröße treffen. Der Detektor für SSC ist in einem Winkel von 90° zur Achse des Laserstrahls ausgerichtet. SSC charakterisiert hauptsächlich die Granularisierung von Zellen.

Auch die vom Streulicht ausgehenden Impulse werden als elektrische Signale der Auswerteinheit zugeführt [88].

Die Auswerteinheit stellt die logarithmisch nachverstärkten Fluoreszenz- und Streulichtimpulse entsprechend ihrer Größe mit Hilfe des Softwareprogramms „Lysis II“ graphisch dar. Wir beurteilten die Aktivierung und Sensibilität der Thrombozyten in Scatterplot-Diagrammen für FSC und SSC sowie in 1-Parameter-Histogrammen für die Fluoreszenz 1 (FL1, FITC).

3.4.2 Voreinstellungen des Gerätes

Die Fluoreszenzeinstellungen des Geräts kalibrierten wir regelmäßig mit „Calibrite-Beads“ und dem Softwareprogramm „Autocomp“ von Becton Dickinson [17].

Da in einer normalen Vollblutprobe die Zahl der Erythrozyten etwa zwanzigfach höher als die der Thrombozyten ist, kann bei hohen Flußraten der Effekt auftreten, daß sich mehrere Erythrozyten zur selben Zeit im Beobachtungsraum eines Thrombozyten befinden und die Messung stören [5]. Aus diesem Grund wurde stets bei sehr geringen Flußraten gemessen (niedrigste Einstellung).

Einen anderen Störfaktor stellen Zelltrümmer (Debris) dar. Diese kleinen Partikel bestehen aus Erythrozyten- und Leukozytenfragmenten, Thrombozytenmikropartikeln und vermutlich auch Immunkomplexen und führen zu fehlerhaften Meßergebnissen [5]. Durch die Einstellung der Schwelle für FSC auf etwa 10 (siehe Abb. 2) verhinderten wir die Einbeziehung von Debris in die Auswertung [6].

Zellen, die nicht Thrombozyten entsprechen, können zwar keine thrombozytenspezifischen Antikörper binden, jedoch eine erhöhte Autofluoreszenz aufweisen und die Meßergebnisse verfälschen [42]. Außerdem waren in dieser Studie mit Thrombozyten assoziierte Zellen nicht von Interesse. Beide Arten von Zellen schlossen wir durch einen Prozeß von der Analyse aus, der als gating bezeichnet wird.

3.4.3 Gating der Thrombozytenpopulation

Jede Messung begann mit der Analyse der physikalischen Eigenschaften aller Zellen der Blutprobe im Scatterplot-Diagramm für FSC und SSC. Dabei erschien jeder Partikel (z. B. Thrombozyt) als ein Punkt, dessen Lage von der Größe des entsprechenden Streulichtimpulses abhing. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften der Blutzellen entstand immer ein Bild mit typisch angeordneten Populationen (siehe Abb. 2): Während die kleinere Population unten links zum größten Teil Thrombozyten repräsentierte, verkörperte die große Population Erythrozyten und Leukozyten, sowohl einzeln als auch mit Thrombozyten assoziiert.

Um im zweiten Schritt der Messung fast nur Plättchen zu analysieren, zogen wir für jede Probe im Scatterplot-Diagramm eine polygonale Linie (siehe Abb. 2) um die Thrombozytenpopulation (gating). Im Vorfeld der Untersuchungen stellten wir sicher, daß mit dieser Methode über 95 % aller Partikel, die sich innerhalb der von der Linie umgrenzten Fläche befanden, und weniger als 5 % aller Partikel außerhalb davon positiv für den thrombozytenspezifischen R-Phycoerythrin-markierten Antikörper gegen GPIIb (CD42b) waren.

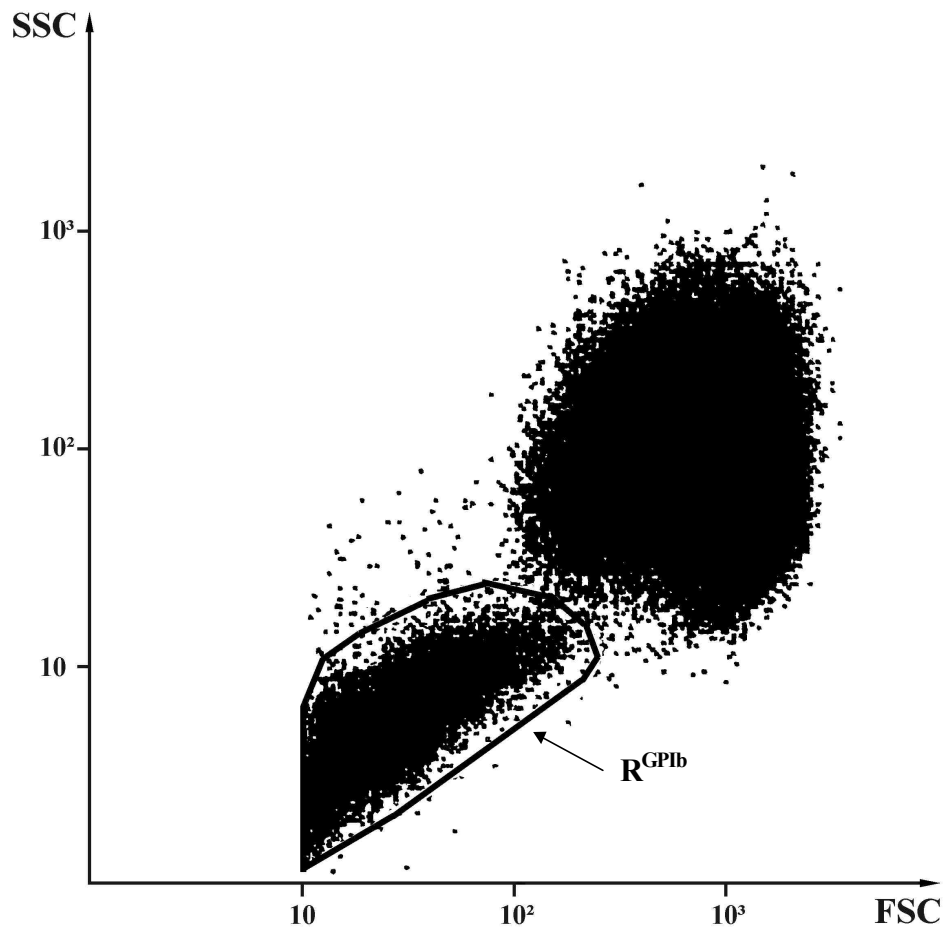


Abb. 2: **Darstellung der Populationen im Scatterplot-Diagramm für FSC und SSC an einem Beispiel mit Angabe der relativen logarithmischen Streulichtintensität** (R^{GPIb} ist die Region, die über 95 % aller GPIb-positiven Partikel enthält.)

3.4.4 Messung mit FITC-markierten Antikörpern

Zur Messung zogen wir 5000 gefärbte Thrombozyten aus dem Bereich der gekennzeichneten Fläche im Scatterplot-Diagramm für FSC und SSC heran.

Wie oben beschrieben, gehörten jeweils drei gefärbte Proben zu einem Set: eine Probe mit FITC-markierten unspezifischen Maus-IgG1-Antikörpern als isotypische Negativkontrolle (im folgenden als Isotypkontrolle bezeichnet), eine Probe mit FITC-markierten Maus-IgG1-Antikörpern gegen P-Selectin (CD62) und eine Probe mit FITC-markierten Maus-IgG1-Antikörpern gegen LIMP-CD63. Die Analyse eines Sets erfolgte in drei 1-Parameter-Histogrammen für die Fluoreszenz 1. In diesen Diagrammen wurden Thrombozyten mit identischer Fluoreszenzintensität in Klassen zusammengefasst (siehe Abb. 3). Die logarithmische Skalierung machte es uns möglich, kleine Zellpopulationen mit einer großen Spannweite der Werte abzugrenzen [88].

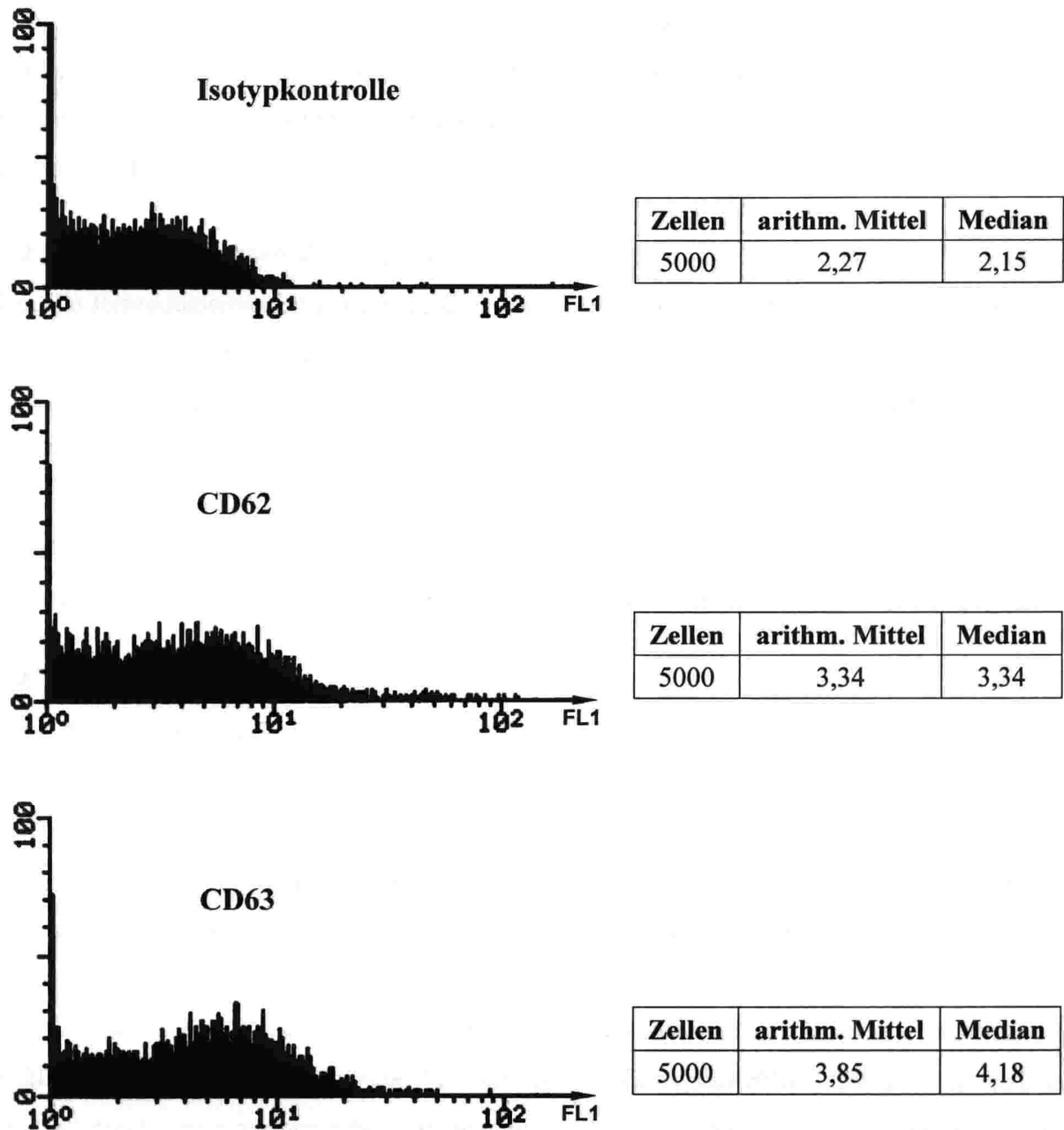


Abb. 3: **Darstellung der Meßreihe eines Sets in 1-Parameter-Histogrammen für die Fluoreszenz 1 an einem Beispiel.** Die Abszisse gibt die Fluoreszenzintensität der Verteilung, die Ordinate die Anzahl von Zellen pro Klasse an. Die Tabellen in der rechten Bildhälfte enthalten ausgewählte statistische Parameter der Verteilungen.

In unsere Auswertung gingen Meßwerte der Fluoreszenzintensität von jeweils 5000 Thrombozyten umfassenden Stichproben ein. Diese Stichproben erfüllten nicht die Kriterien einer Normalverteilung (siehe Abb. 3). Daher analysierten wir die von der Auswerteinheit berechneten und für die Charakterisierung quantitativer, nicht normalverteilter Variablen geeigneten Medianwerte der Fluoreszenzintensität (siehe Abb. 3). Anhand dieser Medianwerte der Stichproben von Thrombozyten, welche mit Antikörpern gegen

CD62 und CD63 markiert wurden, gewannen wir Informationen über Relativzahlen bzw. prozentuale Anteile aktivierter und sensibilisierter Plättchen in den Blutproben.

3.5 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Um die Reproduzierbarkeit der mit unserer Methode erhaltenen Daten aus Einzelmessungen zu überprüfen, ermittelten wir die Intra-Assay-Varianz durch eine zwanzigfache Bestimmung von gleichen Proben im gleichen Assay (umfaßt alle Arbeitsschritte von der Abnahme der Proben bis zur Aufarbeitung der Meßdaten). Die errechneten Variationskoeffizienten lagen in den Grenzen von 5 - 10 %. Mit ihrer Kenntnis konnten wir die durchgeführten Einzelmessungen sowie signifikante Abweichungen in den statistischen Analysen bezüglich des Betrages bzw. der Relevanz einschätzen und verzichteten aus Kostengründen auf Mehrfachbestimmungen der Blutproben.

3.6 Statistik

3.6.1 Voraussetzungen

In dieser Studie sollten Aussagen über das Verhalten von kleinen, zufällig aus einer bestimmten Patienten-Grundgesamtheit ausgewählten Patientengruppen getroffen werden. Diese Gruppen hatten Stichprobencharakter. Aufgrund ihrer Merkmale (Werte), die Ergebnisse von Messungen und Anamnesen darstellten, war auf die Merkmalsverteilung in der jeweiligen Patienten-Grundgesamtheit zu schließen. Ebenso waren Eigenschaften innerhalb einer und Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten-Grundgesamtheiten zu untersuchen. Um diese Forderungen zu erfüllen, führten wir eine statistische Auswertung aller Daten mit Hilfe des Softwareprogramms „SPSS“ durch. Im einzelnen arbeiteten wir mit Ein-, Zwei- und Mehrstichproben-Signifikanztests sowie mit dem „Modell der bivariaten Korrelation nach Spearman“.

Konnten wir die Nullhypothese in einem Test bei festgelegter Irrtumswahrscheinlichkeit (Fehler α bzw. Signifikanzniveau) berechtigt zurückweisen, bestand ein signifikanter Unterschied. Durften wir die Nullhypothese nicht ablehnen, so bedeutete das noch nicht, daß wir sie annahmen, sondern nur, daß das Stichprobenergebnis nicht im Widerspruch zu ihr stand. Es war nicht möglich, mit einem Test anhand des Nichtvorhandenseins signifikanter Unterschiede einen Nachweis für die Gleichheit von Stichproben zu erbringen, da bei festgelegtem kleinen Fehler α die Gefahr des Auftretens des Fehlers β , der die Annahme einer ungültigen Nullhypothese kennzeichnet, zu groß wird [77].

Beim Testen auf Signifikanz trat in der Studie öfter der Fall ein, daß wir ein und dieselbe Stichprobe (Variable) in mehrere Paarvergleiche einbezogen. Da diese Stichprobe möglicherweise Extremfälle beinhaltete und somit selbst ein seltenes Ereignis in bezug auf die Nullhypothese darstellte, hätten sich bei ihrer wiederholten Verwendung fehlerhafte Testurteile häufen können. Das verhinderten wir durch eine Kor-

rektur der Irrtumswahrscheinlichkeit [45]. Eine einfache Methode hierfür war die „Alpha-Adjustierung nach Bonferroni“: Dabei dividierten wir die Irrtumswahrscheinlichkeit durch die Anzahl der Paarvergleiche, zu welchen die Stichprobe herangezogen werden sollte. Die nach diesem Verfahren jeweils korrigierte Irrtumswahrscheinlichkeit der Zweistichprobentests wird im Kapitel Ergebnisse erläutert.

Mit dem „Ein-Stichproben-Kolmogorov-Smirnov-Test [50]“ und der festgesetzten Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$ überprüften wir, ob die Stichproben einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammten und aufgrund dessen für parametrische Testverfahren geeignet waren. Der Test zeigte, daß nur ca. 5 % aller Variablen diese Eignung aufwiesen, so daß wir in Anbetracht einer einheitlichen Methodik ausschließlich parameterfreie Testverfahren anwendeten.

3.6.2 Vergleiche zwischen den Gruppen

Hier fand eine Betrachtung von Merkmalsverteilungen zwischen verschiedenen Patientengruppen (Kontrollgruppen und Interventionsgruppen) statt. Da sich diese Gruppen untereinander nicht beeinflussen, wendeten wir Testverfahren für unabhängige Stichproben an.

Um festzustellen, bei welchen Variablen der Gruppen signifikante Unterschiede auftraten, führten wir den für mehrere Stichproben geeigneten „Kruskal-Wallis H-Test“ mit der festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$ durch. Für den Vergleich zweier einzelner Gruppen und die Einschätzung, ob ein Anstieg oder eine Abnahme der Niveaus der Meßwerte eintrat, setzten wir den „U-Test von Mann und Whitney“ ein [50].

3.6.3 Vergleiche innerhalb der Gruppen

An dieser Stelle untersuchten wir die Merkmalsverteilungen innerhalb einer Patientengruppe. Die in die Analyse einbezogenen Meßwerte stammten von Proben unterschiedlicher Entnahmezeitpunkte (vor, direkt nach und 4 Stunden nach einer Intervention) aus einem bestimmten Gefäß oder von Proben unterschiedlicher Gefäße (arteriell und venös), die wir zu einem bestimmten Zeitpunkt entnahmen. Diese Meßwerte hingen voneinander ab und erforderten Testverfahren für abhängige Stichproben.

Ähnlich wie bei den Tests für unabhängige Stichproben diente uns zum Aufsuchen von signifikanten Unterschieden zwischen den drei Abnahmezeitpunkten zuerst ein Prüfverfahren für mehrere Stichproben, der „Friedman-Test“ mit der festgesetzten Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$. Mit dem „Wilcoxon-Test (Matched pairs signed rank test)“ beurteilten wir die Tendenz dieser Unterschiede [50].

3.6.4 Vergleiche zwischen den Interventionen

Hier verglichen wir die Interventionen KM und PTA direkt miteinander, indem wir Patienten untersuchten, welche beiden Eingriffen unterzogen wurden (Gruppe „KM und PTA“). Da wir dieselben Patienten bei unterschiedlichen Eingriffen beobachteten, hingen alle Meßwerte voneinander ab. Somit wendeten

wir, wie auch bei den Testverfahren innerhalb der Gruppen, den „Wilcoxon-Test“ mit der festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$ an. Um unterschiedliche Auswirkungen der Interventionen auf die Thrombozytenaktivierung zu analysieren, setzten wir relative prozentuale Differenzen zwischen den Abnahmezeitpunkten in den Test ein. Sie wurden nach folgender Formel gebildet: $100 [(Zeitpunkt\ 1 - Zeitpunkt\ 2) / Zeitpunkt\ 1]$.

3.6.5 Bivariate Korrelation nach Spearman

Die Rohdaten verdeutlichten, daß die Patienten innerhalb der Gruppen nicht in allen Interventionsbedingungen miteinander übereinstimmten. Aufgrund dessen bestand die Möglichkeit, daß ein Zusammenhang zwischen den Meßwerten und voneinander abweichenden Dilatationszeiten und -strecken sowie KM- und Heparinmengen existierte und somit unterschiedliche Interventionsbedingungen einen Einfluß auf die Meßwerte ausübten.

Mit dem in dieser Studie angewendeten „Modell der bivariaten Korrelation nach Spearman“ quantifizierten wir die Stärke der linearen Beziehung zwischen zwei Variablen. Dieses Modell ist für ordinal- und intervallskalierte Daten geeignet, die nicht den Normalitätsvoraussetzungen entsprechen. Der Spearman'sche Korrelationskoeffizient r kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Das Vorzeichen kennzeichnet einen positiven oder negativen linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen, der absolute Wert zeigt die Stärke dieses Zusammenhangs an. Der Wert 0 bedeutet, daß die beiden Variablen in keiner linearen Beziehung zueinander stehen [77]. Auch hier gingen relative prozentuale Differenzen zwischen den Abnahmezeitpunkten in die Berechnungen ein, die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Korrelationskoeffizienten r setzten wir auf $p = 0,05$ fest.

4 Ergebnisse

Eine statistische Auswertung der Daten aus den Tabellen 1 und 2 (siehe Tabelle 1, Tabelle 2) nahmen wir nicht vor, da die Werte aus Anamnese und Paraklinik eine einheitliche Tendenz aufzeigten. Außerdem hatten sie bis auf die Variable „Alter“ nur ein nominales Skalierungsniveau, was bei der kleinen Anzahl von Beobachtungswerten pro Stichprobe (Gruppe) die Aussage statistischer Tests unsicher erscheinen ließ. Die Unterschiede in den intervallskalierten Daten zwischen den Interventionen DSA und PTA waren bekannt und machten mathematische Nachweise überflüssig.

Daher wurden nur solche Daten statistisch analysiert, die sich auf Interventionseinflüsse innerhalb einer Gruppe oder auf Meßwerte der Immunfluoreszenz bezogen.

Die Diagramme unter 4.1 bis 4.3 sind Boxplots, innerhalb der die Verteilung von Werten durch ein Rechteck charakterisiert wird. Eine horizontale Linie innerhalb des Rechtecks kennzeichnet den Median. Die untere Grenze des Rechtecks entspricht der 25. und die obere Grenze der 75. Perzentile der Verteilung. Die 10. und 90. Perzentile sind jeweils als ein durch eine senkrechte Linie mit dem Rechteck verbundener Balken dargestellt. Symbole außerhalb der 10. und 90. Perzentile repräsentieren Ausreißer (O) bzw. Extremwerte (X). Unter den Boxplots sind die Mediane der Verteilungen in eckigen Klammern, signifikante Ergebnisse mit den relativen Wahrscheinlichkeiten (p) für die Nullhypothese der Testverfahren sowie in einigen Fällen Mediane, Minima und Maxima der Ausgangsverteilungen aufgeführt.

Die Diagramme unter 4.4 stellen Scatterplots dar. Die bei signifikanten Ergebnissen angegebenen relativen Wahrscheinlichkeiten für die Nullhypothese beziehen sich auf den Spearman'schen Korrelationskoeffizienten r . Bei Beträgen von $r > 0,2$ wurden mit dem „Modell der linearen Regressionsanalyse“ berechnete Regressionsgeraden und Konfidenzintervalle bei einem Niveau von 95 % eingezeichnet. Mediane, Minima und Maxima charakterisieren die Ausgangsverteilungen.

In allen Diagrammen wurde die Achsenskalierung der Ordinaten an die Fluoreszenzdaten angepaßt, um kleine Unterschiede zwischen Medianen und Anstiegen optisch hervorzuheben.

4.1 Vergleiche mit den Kontrollgruppen

Da die verglichenen Gruppen unabhängig voneinander waren, wendeten wir als Testverfahren den „Kruskal-Wallis H-Test“ und den „U-Test von Mann und Whitney“ an. In die Berechnungen gingen die Meßwerte der mit einer Kanüle entnommenen venösen Blutproben der Kontrollgruppen und die Meßwerte der Blutproben der Gruppen KM und PTA ein, die wir aus der venösen Schleuse vor Beginn der Eingriffe abnahmen.

4.1.1 Vergleich zwischen den Gruppen KG1 und KG2

Das festgelegte Signifikanzniveau betrug nach Korrektur durch die „Alpha-Adjustierung nach Bonferro-
ni“ aufgrund der Einbeziehung der Gruppe KG1 in drei Paarvergleiche $p = 0,02$.

4.1.1.1 Nativ

Die Medianwerte der Fluoreszenzintensität der nativen venösen Proben der Gruppe KG1 waren bei CD62 und CD63 signifikant größer als bei der Gruppe KG2 (siehe Abb. 4, Abb. 5). Die Isotypkontrollen änderten sich nicht signifikant. Somit war die Relativzahl aktivierter Thrombozyten bei Patienten mit PAVK gegenüber gesunden Probanden erhöht.

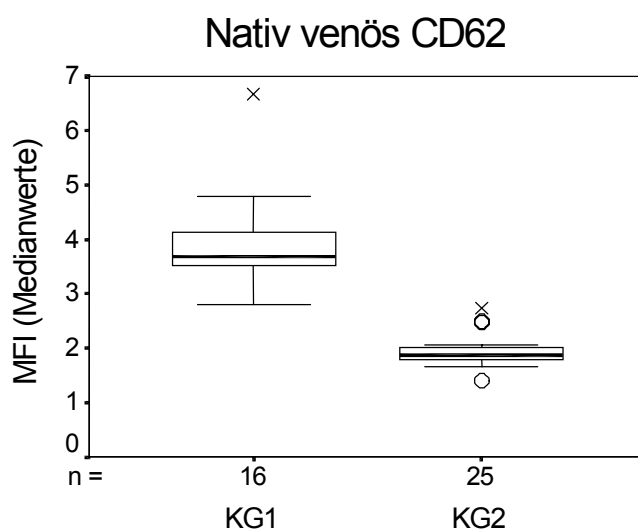


Abb. 4: **Vergleich von KG1 mit KG2 (nativ, venös, CD62)**; KG1 [3,68] > KG2 [1,88]; ($p = 0,0001$);
Isotypkontrollen: KG1 [1,62] < KG2 [1,75] (n. s.)

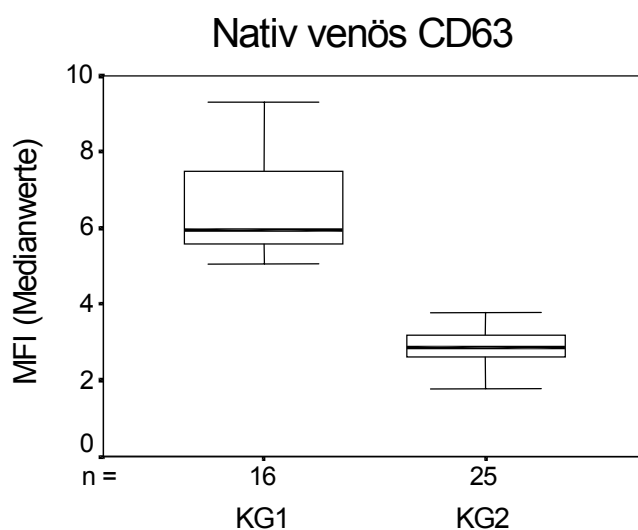


Abb. 5: **Vergleich von KG1 mit KG2 (nativ, venös, CD63)**; KG1 [5,97] > KG2 [2,86] ($p = 0,0001$);
Isotypkontrollen: KG1 [1,62] < KG2 [1,75] (n. s.)

4.1.1.2 Aktiviert

Bei den in vitro aktivierten Proben zeigten sich bei CD63 signifikant höhere Medianwerte der Fluoreszenzintensität in der Gruppe KG1 im Vergleich zur Gruppe KG2 (siehe Abb. 7). Der Marker CD62 konnte keinen signifikanten Unterschied aufdecken (siehe Abb. 6). Die Isotypkontrollen wichen nicht signifikant voneinander ab. Die Patienten mit PAVK wiesen demzufolge auch eine höhere Relativzahl sensibilisierter Thrombozyten als gesunde Probanden auf.

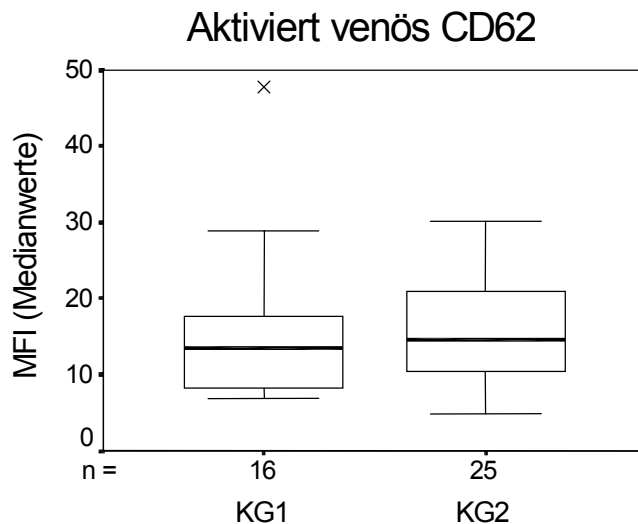


Abb. 6: **Vergleich von KG1 mit KG2 (aktiviert, venös, CD62)**; KG1 [13,47] < KG2 [14,59] (n. s.); Isotypkontrollen: KG1 [1,56] < KG2 [1,73] (n. s.)

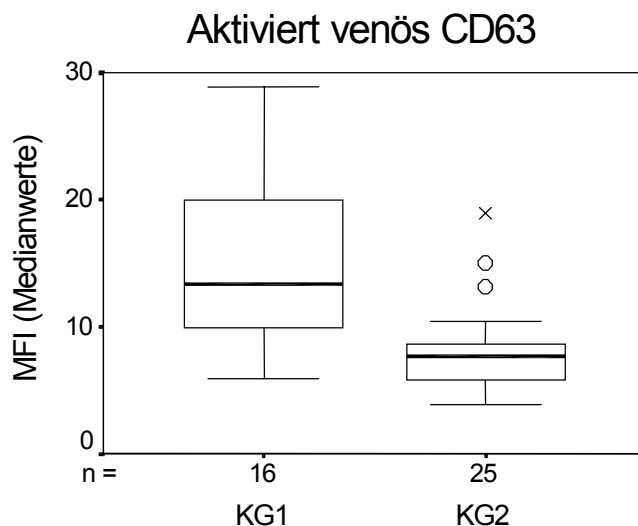


Abb. 7: **Vergleich von KG1 mit KG2 (aktiviert, venös, CD63)**; KG1 [13,4] > KG2 [7,64] ($p = 0,0001$); Isotypkontrollen: KG1 [1,56] < KG2 [1,73] (n. s.)

4.1.2 Vergleich der Gruppe KG1 mit den Gruppen KM und PTA

Da wir die venösen Proben des Zeitpunktes vor den Interventionen DSA bzw. PTA in 4 Paarvergleiche einbezogen, hatte das festgelegte Signifikanzniveau nach Korrektur durch die „Alpha-Adjustierung nach Bonferroni“ einen Wert von $p = 0,01$.

4.1.2.1 Vergleich zwischen den Gruppen KG1 und KM

Die Medianwerte der Fluoreszenzintensität der nativen und der in vitro aktivierten Proben wiesen weder bei CD62 noch bei CD63 signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe KG1 und der Gruppe KM auf. Auch bei den Isotypkontrollen traten zwischen den Gruppen keine signifikanten Abweichungen in den Medianwerten der Fluoreszenzintensität auf (ohne Abb.). Es konnte somit kein Nachweis für die Existenz signifikanter Unterschiede im prozentualen Anteil aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten zwischen den mit einer Kanüle abgenommenen und den aus einer venösen Schleuse stammenden Proben erbracht werden.

4.1.2.2 Vergleich zwischen den Gruppen KG1 und PTA

Bei den Medianwerten der Fluoreszenzintensität der nativen und der in vitro aktivierten Proben waren weder bei CD62 noch bei CD63 signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe KG1 und der Gruppe PTA vorhanden. Signifikante Unterschiede der Medianwerte der Fluoreszenzintensität existierten auch nicht bei den Isotypkontrollen dieser Gruppen (ohne Abb.). Diese Beobachtung stimmte mit dem Ergebnis des Vergleichs unter 4.1.2.1 überein.

Somit konnte ein Einfluß der Abnahmemethode auf die Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten in den Proben nicht aufgezeigt werden.

4.2 Vergleiche innerhalb der Gruppen KM und PTA

Die Meßwerte der Proben, die innerhalb einer Gruppe aus einem bestimmten Gefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder zu einem bestimmten Zeitpunkt aus verschiedenen Gefäßen (arteriell und venös) jeweils unter Verwendung von Schleusen entnommen wurden, waren voneinander abhängig. Deshalb führten wir hier den „Friedman-Test“ und den „Wilcoxon-Test“ durch.

Das festgelegte Signifikanzniveau für die in 4 Paarvergleiche einbezogenen venösen Proben des Zeitpunktes vor den Interventionen DSA bzw. PTA betrug nach Korrektur durch die „Alpha-Adjustierung nach Bonferroni“ $p = 0,01$. Für alle anderen Proben, die nur in drei Paarvergleiche eingingen, hatte das festgelegte Signifikanzniveau nach der Korrektur einen Wert von $p = 0,02$.

4.2.1 Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM

4.2.1.1 Nativ arteriell

Bei den nativen arteriellen Proben wurde erkennbar, daß die Medianwerte der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt „4 h nach KM“ bei CD62 und CD63 signifikant unter denen des Zeitpunktes „nach KM“ lagen. Die Isotypkontrollen änderten sich nicht signifikant (siehe Abb. 8, Abb. 9). Der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten war demzufolge im arteriellen Stromgebiet zum Zeitpunkt „4 h nach KM“ kleiner als zum Zeitpunkt „nach KM“.

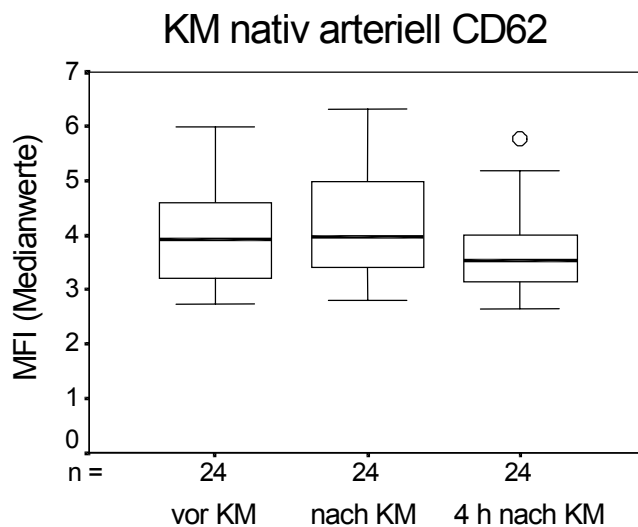


Abb. 8: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (nativ, arteriell, CD62)**; vor [3,92] < nach [3,96] (n. s.); vor > 4 h nach [3,54] (n. s.); nach > 4 h nach ($p = 0,004$); Isotypkontrollen: vor [1,78] < nach [1,91] > 4 h nach [1,75] (n. s.)

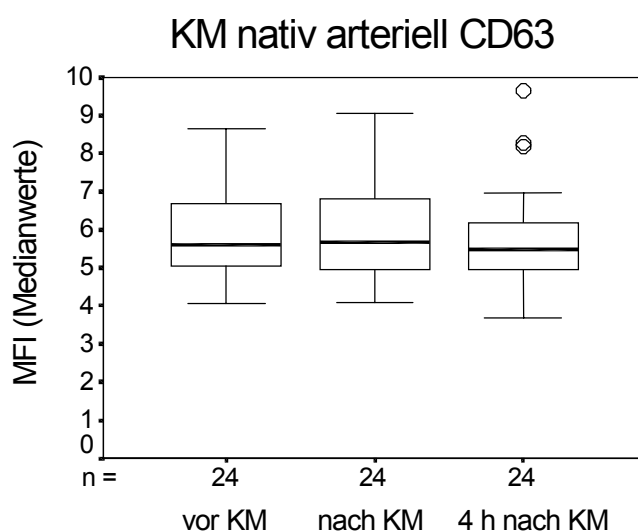


Abb. 9: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (nativ, arteriell, CD63)**; vor [5,6] < nach [5,67] (n. s.); vor > 4 h nach [5,5] (n. s.); nach > 4 h nach ($p = 0,015$); Isotypkontrollen: vor [1,78] < nach [1,91] > 4 h nach [1,75] (n. s.)

4.2.1.2 *Nativ venös*

Die nativen venösen Proben wiesen bei CD63 eine signifikante Abnahme der Medianwerte der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt „4 h nach KM“ gegenüber dem Zeitpunkt „nach KM“ auf. Bei CD62 sowie den Isotypkontrollen existierten keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 10, Abb. 11). Die Relativzahl faktivierter Plättchen im lokalen Effluat der manipulierten Gefäßabschnitte war somit zum Zeitpunkt „4 h nach KM“ kleiner als direkt nach KM. Bei den nativen Proben aus dem arteriellen und venösen Bereich traten signifikante Unterschiede beim Vergleich der 4-h-Werte mit den Werten direkt nach KM auf und zeigten einen verringerten prozentualen Anteil aktivierter Thrombozyten zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA an.

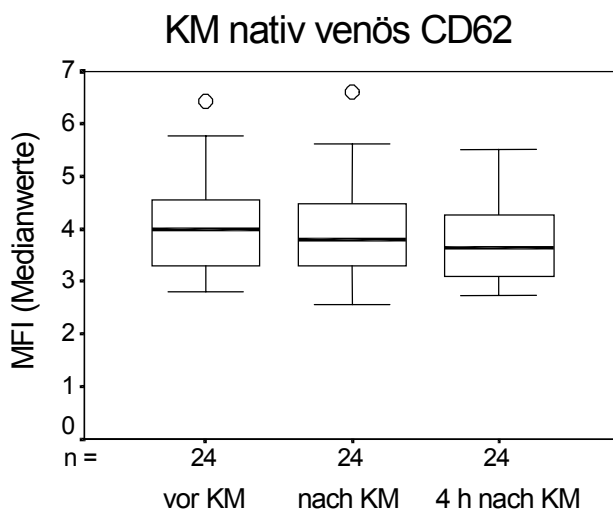


Abb. 10: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (nativ, venös, CD62)**; vor [4] > nach [3,81] (n. s.); vor > 4 h nach [3,64] (n. s.); nach > 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,86] < nach [1,87] > 4 h nach [1,69] (n. s.)

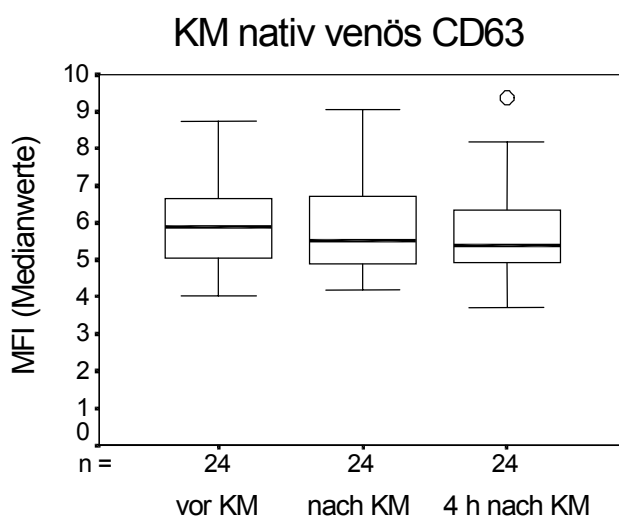


Abb. 11: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (nativ, venös, CD63)**; vor [5,88] > nach [5,52] (n. s.); vor > 4 h nach [5,4] (n. s.); nach > 4 h nach ($p = 0,006$); Isotypkontrollen: vor [1,86] < nach [1,87] > 4 h nach [1,69] (n. s.)

4.2.1.3 Aktiviert arteriell

Bei den in vitro aktivierten arteriellen Proben wurde deutlich, daß die Medianwerte der Fluoreszenzintensität bei CD62 und CD63 zum Zeitpunkt „4 h nach KM“ signifikant über denen des Zeitpunktes „vor KM“ lagen (siehe Abb. 12, Abb. 13). Die Isotypkontrollen wichen nicht signifikant voneinander ab. Daran wurde eine vermehrte Relativzahl sensibilisierter Thrombozyten im arteriellen Stromgebiet zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA erkennbar.

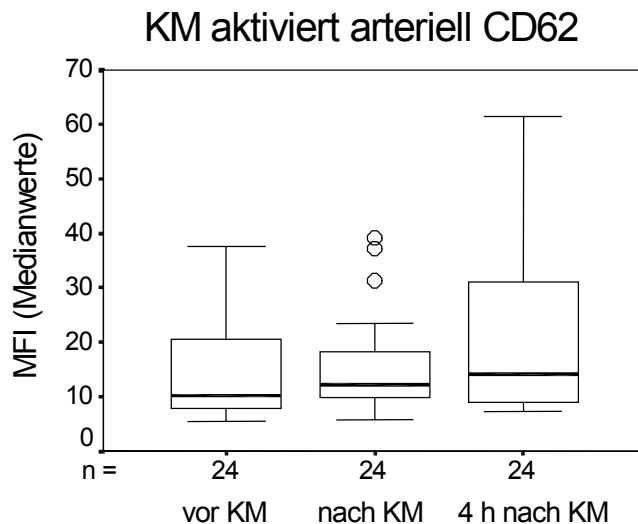


Abb. 12: Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (aktiviert, arteriell, CD62); vor [10,14] < nach [12,08] (n. s.); vor < 4 h nach [14,05] ($p = 0,012$); nach < 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,9] > nach [1,89] < 4 h nach [1,92] (n. s.)

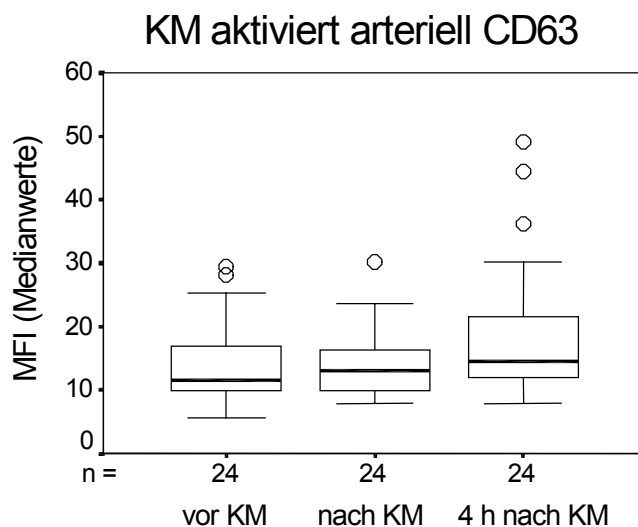


Abb. 13: Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (aktiviert, arteriell, CD63); vor [11,56] < nach [13,11] (n. s.); vor < 4 h nach [14,53] ($p = 0,014$); nach < 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,9] > nach [1,89] < 4 h nach [1,92] (n. s.)

4.2.1.4 Aktiviert venös

Bei den in vitro aktivierten venösen Proben wurde ersichtlich, daß die Medianwerte der Fluoreszenzintensität bei CD62 und CD63 zum Zeitpunkt „4 h nach KM“ signifikant diejenigen der Zeitpunkte „vor KM“ und „nach KM“ überstiegen (siehe Abb. 14, Abb. 15). Die Isotypkontrollen änderten sich nicht signifikant. Zum Zeitpunkt „4 h nach KM“ war demzufolge auch im lokalen Effluat der manipulierten Gefäßabschnitte die Relativzahl sensibilisierter Thrombozyten erhöht.

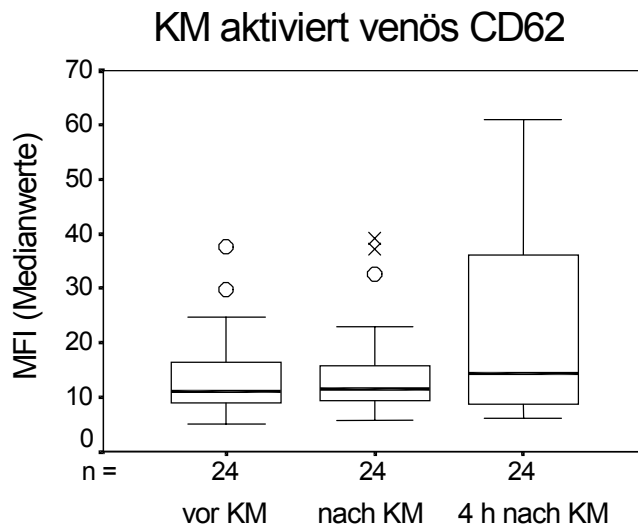


Abb. 14: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (aktiviert, venös, CD62)**; vor [11,14] < nach [11,42] (n. s.); vor < 4 h nach [14,40] ($p = 0,005$); nach < 4 h nach ($p = 0,009$); Isotypkontrollen: vor [1,92] > nach [1,88] < 4 h nach [1,91] (n. s.)

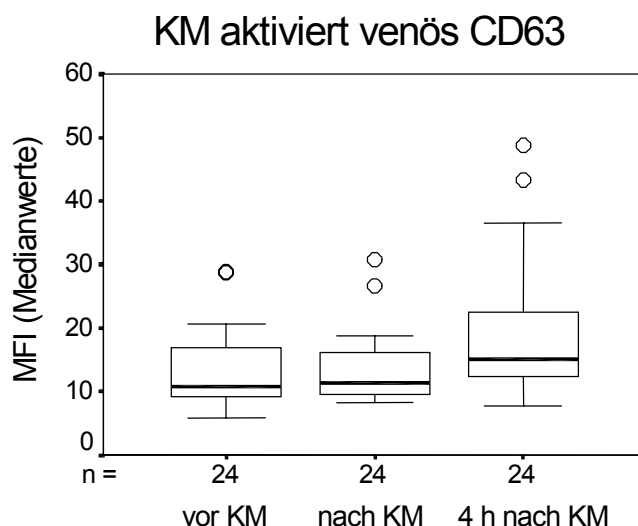


Abb. 15: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (aktiviert, venös, CD63)**; vor [10,7] < nach [11,34] (n. s.); vor < 4 h nach [15,08] ($p = 0,002$); nach < 4 h nach ($p = 0,004$); Isotypkontrollen: vor [1,92] > nach [1,88] < 4 h nach [1,91] (n. s.)

4.2.2 Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA

4.2.2.1 Nativ arteriell

Die nativen arteriellen Proben wiesen bei CD62 eine signifikante Verringerung der Medianwerte der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt „4 h nach PTA“ gegenüber dem Zeitpunkt „vor PTA“ auf. Bei CD63 sowie den Isotypkontrollen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 16, Abb. 17). Der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten war somit in der systemischen arteriellen Zirkulation zum Zeitpunkt „4 h nach PTA“ vermindert.

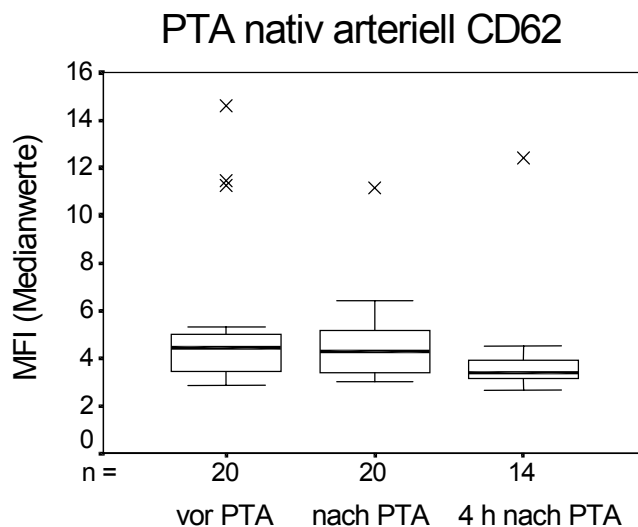


Abb. 16: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (nativ, arteriell, CD62)**; vor [4,43] > nach [4,26] (n. s.); vor > 4 h nach [3,36] ($p = 0,019$); nach > 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,85] > nach [1,78] > 4 h nach [1,74] (n. s.)

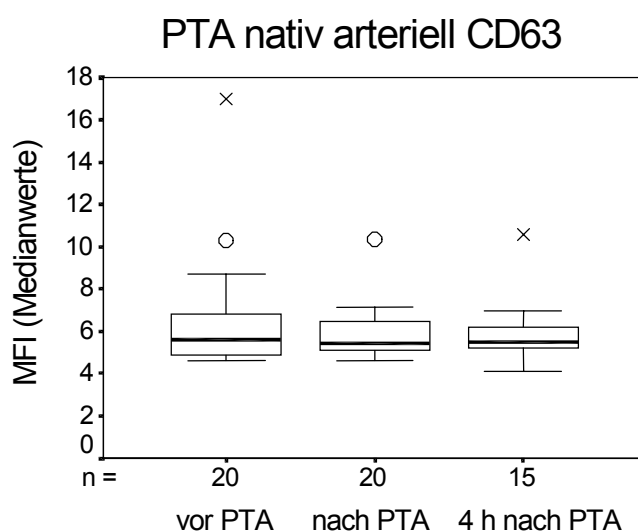


Abb. 17: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (nativ, arteriell, CD63)**; vor [5,6] > nach [5,45] (n. s.); vor > 4 h nach [5,47] (n. s.); nach < 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,85] > nach [1,78] > 4 h nach [1,74] (n. s.)

4.2.2.2 *Nativ venös*

Bei den nativen venösen Proben trat zum Zeitpunkt „4 h nach der PTA“ bei CD62 und CD63 (siehe Abb. 18, Abb. 19) eine signifikante Senkung der Medianwerte der Fluoreszenzintensität unter das Niveau direkt nach der PTA ein. Die Isotypkontrollen wichen nicht signifikant voneinander ab. Demzufolge kam es zum Zeitpunkt „4 h nach PTA“ im lokalen Effluat der manipulierten Gefäßabschnitte zu einem Abfall des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten. Somit ergaben sich bei den nativen Proben aus dem arteriellen und venösen Bereich signifikante Unterschiede beim Vergleich der 4-h-Werte mit den Werten vor oder direkt nach PTA und belegten eine verringerte Relativzahl aktivierter Plättchen zum Zeitpunkt 4 h nach der Intervention.

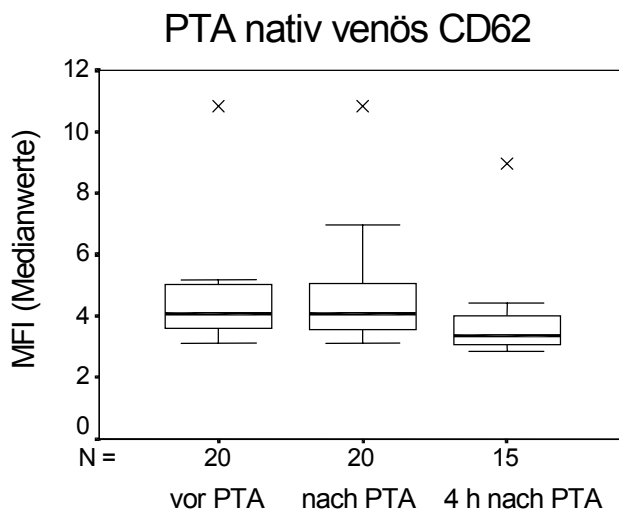


Abb. 18: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (nativ, venös, CD62)**; vor [4,07] < nach [4,09] (n. s.); vor > 4 h nach [3,34] (n. s.); nach > 4 h nach ($p = 0,011$); Isotypkontrollen: vor [1,85] > nach [1,84] > 4 h nach [1,74] (n. s.)

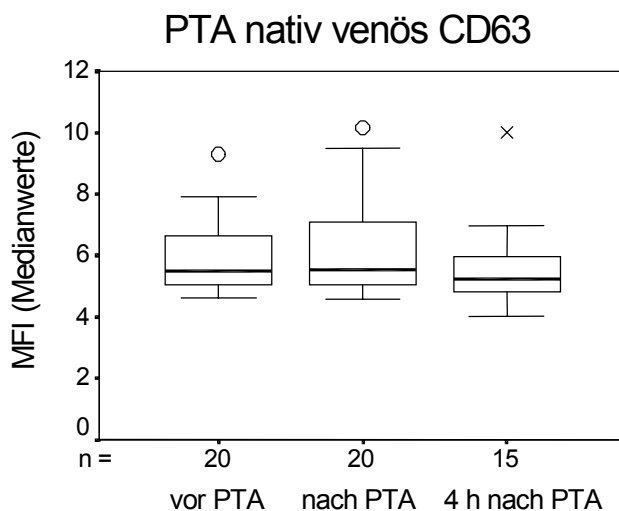


Abb. 19: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (nativ, venös, CD63)**; vor [5,5] < nach [5,53] (n. s.); vor > 4 h nach [5,23] (n. s.); nach > 4 h nach ($p = 0,005$); Isotypkontrollen: vor [1,85] > nach [1,84] > 4 h nach [1,74] (n. s.)

4.2.2.3 Aktiviert arteriell

Kein Vergleich zwischen den Abnahmezeitpunkten der in vitro aktivierten arteriellen Proben konnte einen Nachweis für die Existenz signifikanter Unterschiede in bezug auf die Isotypkontrollen und den prozentualen Anteil sensibilisierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation erbringen (siehe Abb. 20, Abb. 21).

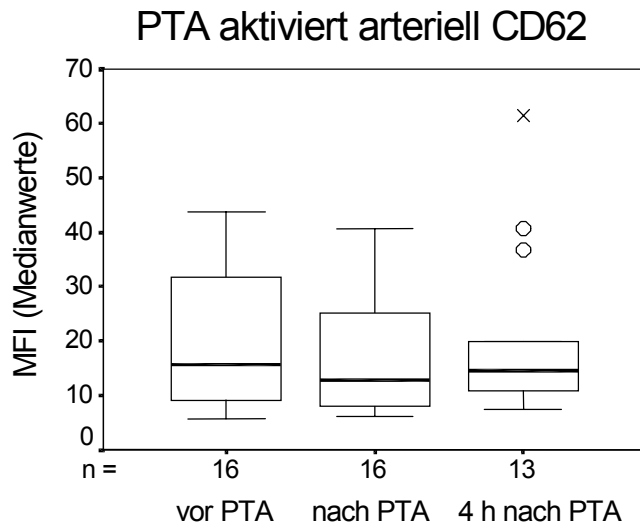


Abb. 20: Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (aktiviert, arteriell, CD62); vor [15,73] > nach [12,81] (n. s.); vor > 4 h nach [14,46] (n. s.); nach < 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,86] > nach [1,84] > 4 h nach [1,64] (n. s.)

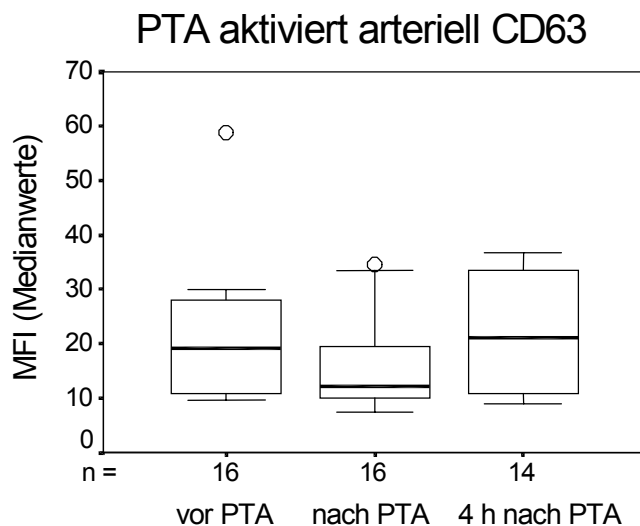


Abb. 21: Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (aktiviert, arteriell, CD63); vor [19,04] > nach [12,19] (n. s.); vor < 4 h nach [21,2] (n. s.); nach < 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,86] > nach [1,84] > 4 h nach [1,64] (n. s.)

4.2.2.4 Aktiviert venös

Auch bei den in vitro aktivierten venösen Proben konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den Abnahmezeitpunkten bezüglich der Isotypkontrollen sowie der Relativzahl sensibilisierter Thrombozyten im lokalen Effluat der alterierten Gefäßabschnitte nachweisen (siehe Abb. 22, Abb. 23).

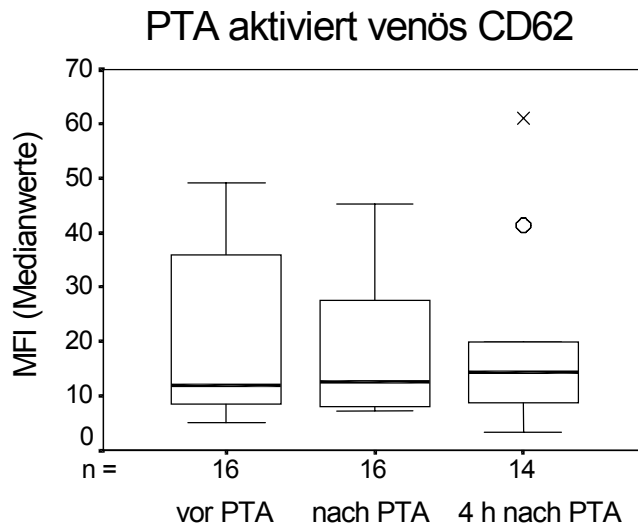


Abb. 22: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (aktiviert, venös, CD62)**; vor [11,96] < nach [12,61] (n. s.); vor < 4 h nach [14,4] (n. s.); nach < 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,85] < nach [1,86] > 4 h nach [1,85] (n. s.)

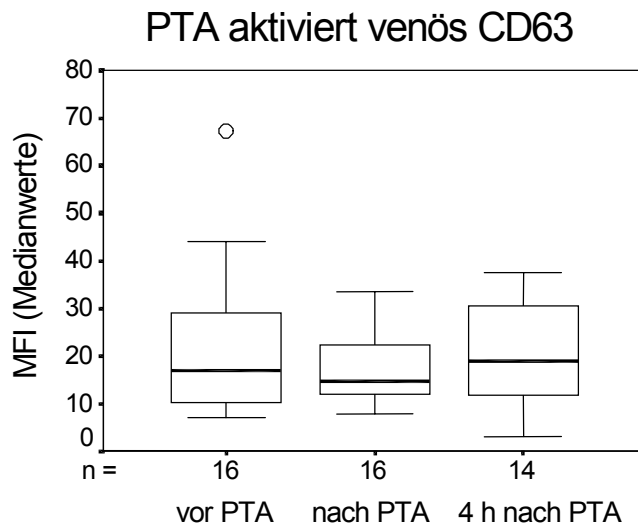


Abb. 23: **Vergleich der Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (aktiviert, venös, CD63)**; vor [16,83] > nach [14,66] (n. s.); vor < 4 h nach [18,98] (n. s.); nach < 4 h nach (n. s.); Isotypkontrollen: vor [1,85] < nach [1,86] > 4 h nach [1,85] (n. s.)

4.2.3 Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten in der Gruppe KM

Beim Vergleich der arteriellen mit den venösen Proben, die wir zum selben Zeitpunkt abnahmen, traten innerhalb der Gruppe KM ex vivo und in vitro keine signifikanten Unterschiede auf (ohne Abb.). Somit konnten wir nicht davon ausgehen, daß zu einem bestimmten Abnahmezeitpunkt eine Differenz in der Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten zwischen dem arteriellen Stromgebiet und dem venösen lokalen Effluat der manipulierten Gefäßabschnitte bestand.

4.2.4 Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten in der Gruppe PTA

Auch der Vergleich zwischen den arteriellen und venösen Proben derselben Abnahmezeitpunkte innerhalb der Gruppe PTA lieferte ex vivo und in vitro keinen Beweis für die Existenz signifikanter Unterschiede (ohne Abb.). Diese Beobachtung stimmte mit dem beschriebenen Ergebnis aus der Gruppe KM überein.

4.3 Vergleich der Gruppe KM mit der Gruppe PTA

Hier verglichen wir die Interventionen KM und PTA direkt miteinander, indem wir bei Patienten sowohl eine intraarterielle DSA als auch eine wenige Tage später durchgeführte PTA untersuchten (Gruppe „KM und PTA“). Da dieselben Patienten bei unterschiedlichen Eingriffen beobachtet wurden, hingen alle Meßwerte voneinander ab, und wir wendeten den Wilcoxon-Test an. Das festgelegte Signifikanzniveau betrug $p = 0,05$.

In die Testverfahren gingen die relativen prozentualen Differenzen ein, die jeweils zwischen den Werten der Abnahmezeitpunkte vor und direkt nach bzw. vor und 4 h nach einem Eingriff bestanden. Diese Differenzen eines Eingriffs verglichen wir mit den auf die gleiche Weise gebildeten Differenzen des anderen Eingriffs.

4.3.1 Vergleich der relativen prozentualen vor-nach-Differenzen

Beim Vergleich der Gruppen KM und PTA anhand der relativen prozentualen Änderungen der Medianwerte der Fluoreszenzintensität zwischen den Zeitpunkten vor und unmittelbar nach den Eingriffen trat ein signifikanter Unterschied bei den nativen arteriellen Proben auf, die mit Anti-CD62 markiert wurden. Hier lag die Verteilung der gebildeten Differenzen bei der Gruppe KM im Verhältnis zur Gruppe PTA mehr im negativen Bereich. Die Werte der Isotypkontrollen der Gruppen wichen in ihrer Lage nicht signifikant voneinander ab (siehe Abb. 24).

Die negativere Lage der Differenzen wurde von höheren Werten direkt nach der DSA verursacht. Diese Beobachtung bedeutete, daß die Relativzahl zirkulierender aktivierter Thrombozyten im arteriellen

Stromgebiet direkt nach den Eingriffen im Vergleich zum Ausgangsniveau bei der DSA höher war als bei der PTA.

Alle anderen Vergleiche (siehe Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27), auch die der in vitro aktivierten Proben (ohne Abb.), wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Eingriffen nach.

4.3.1.1 Nativ arteriell

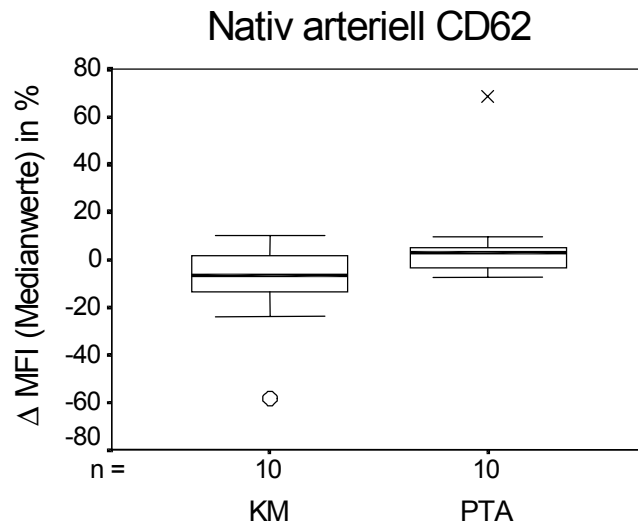


Abb. 24: **Vergleich von KM mit PTA (nativ, arteriell, CD62)**; KM [-6,9] < PTA [2,61] ($p = 0,021$); Werte vor KM: [3,77]; Min.: 2,86; Max.: 5,28; Werte vor PTA: [3,63]; Min.: 2,86; Max.: 14,59; Isotypkontrollen: KM [-2,38] < PTA [4,08] (n. s.)

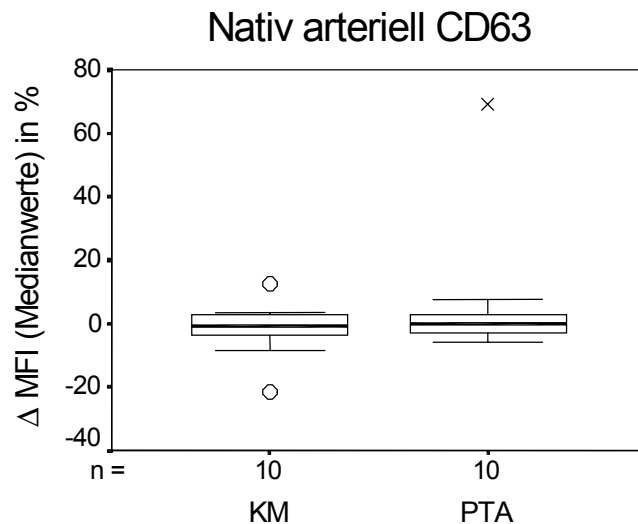


Abb. 25: **Vergleich von KM mit PTA (nativ, arteriell, CD63)**; KM [-0,99] < PTA [0,06] (n. s.); Werte vor KM: [5,35]; Min.: 4,7; Max.: 7,23; Werte vor PTA: [5,41]; Min.: 4,7; Max.: 17; Isotypkontrollen: KM [-2,38] < PTA [4,08] (n. s.)

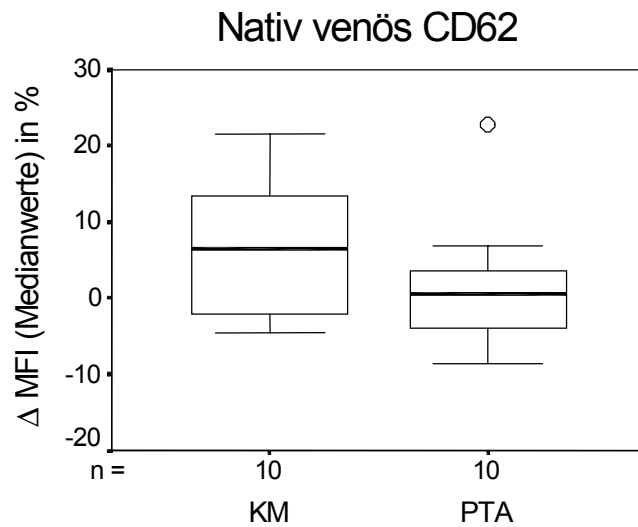
4.3.1.2 *Nativ venös*

Abb. 26: **Vergleich von KM mit PTA (nativ, venös, CD62)**; KM [6,51] > PTA [0,5] (n. s.); Werte vor KM: [4,03]; Min.: 3,11; Max.: 5,38; Werte vor PTA: [3,8]; Min.: 3,11; Max.: 5,19; Isotypkontrollen: KM [2,59] > PTA [-0,91] (n. s.)

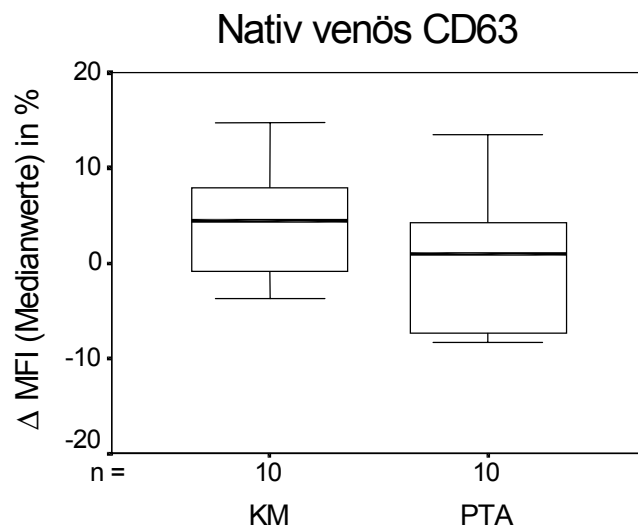


Abb. 27: **Vergleich von KM mit PTA (nativ, venös, CD63)**; KM [4,41] > PTA [0,98] (n. s.); Werte vor KM: [5,7]; Min.: 4,87; Max.: 7,3; Werte vor PTA: [5,4]; Min.: 4,87; Max.: 7,23; Isotypkontrollen: KM [2,59] > PTA [-0,91] (n. s.)

4.3.2 Vergleich der relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen

Die Gruppen KM und PTA wichen hinsichtlich der relativen prozentualen Änderungen der Medianwerte der Fluoreszenzintensität zwischen den Zeitpunkten vor und 4 h nach den Eingriffen weder bei den nativen (siehe Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30, Abb. 31) noch bei den in vitro aktivierten Proben (ohne Abb.) signifikant voneinander ab. Somit konnten wir zwischen den Interventionen intraarterielle DSA und PTA beim Vergleich der Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Plättchen zum Zeitpunkt 4 h nach den Eingriffen bezüglich des jeweiligen Ausgangsniveaus keinen Nachweis für die Existenz signifikanter Unterschiede erbringen. Das traf für das venöse und arterielle Stromgebiet zu.

4.3.2.1 Nativ arteriell

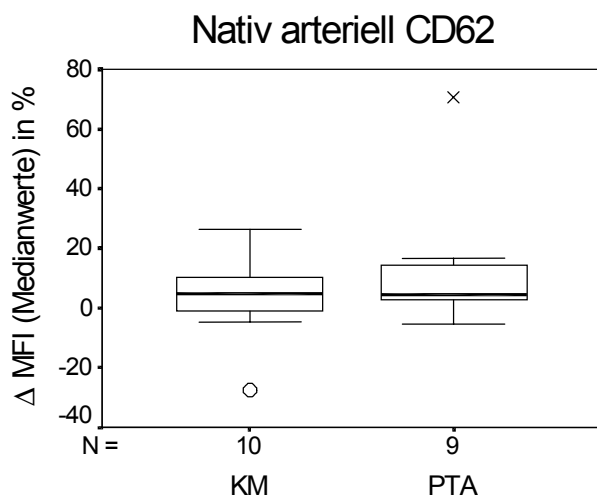


Abb. 28: **Vergleich von KM mit PTA (nativ, arteriell, CD62)**; KM [4,73] > PTA [4,47] (n. s.); Werte vor KM: [3,77]; Min.: 2,86; Max.: 5,28; Werte vor PTA: [3,63]; Min.: 2,86; Max.: 14,59; Isotypkontrollen: KM [1,99] < PTA [2,08] (n. s.)

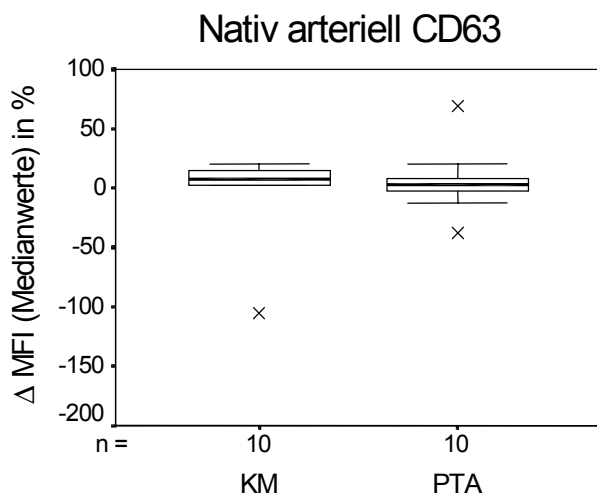


Abb. 29: **Vergleich von KM mit PTA (nativ, arteriell, CD63)**; KM [7,28] > PTA [3,07] (n. s.); Werte vor KM: [5,35]; Min.: 4,7; Max.: 7,23; Werte vor PTA: [5,41]; Min.: 4,7; Max.: 17; Isotypkontrollen: KM [1,99] < PTA [2,08] (n. s.)

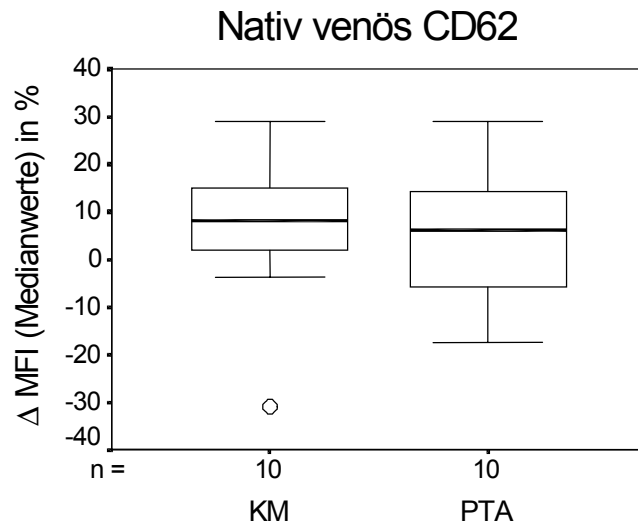
4.3.2.2 *Nativ venös*

Abb. 30: **Vergleich von KM mit PTA (nativ, venös, CD62)**; KM [8,13] > PTA [6,05] (n. s.); Werte vor KM: [4,03]; Min.: 3,11; Max.: 5,38; Werte vor PTA: [3,8]; Min.: 3,11; Max.: 5,19; Isotypkontrollen: KM [0,96] < PTA [1,96] (n. s.)

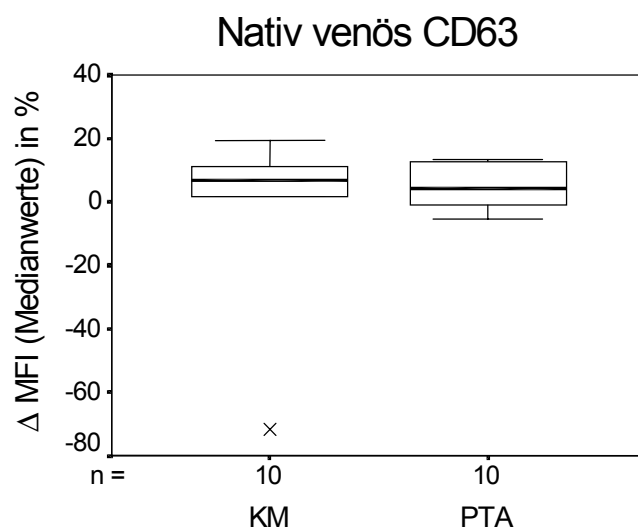


Abb. 31: **Vergleich von KM mit PTA (nativ, venös, CD63)**; KM [6,98] > PTA [4,35] (n. s.); Werte vor KM: [5,7] Min.: 4,87; Max.: 7,3; Werte vor PTA: [5,4]; Min.: 4,87; Max.: 7,23; Isotypkontrollen: KM [0,96] < PTA [1,96] (n. s.)

4.4 Einflüsse auf die Gruppen KM und PTA

Mit Hilfe des „Modells der bivariaten Korrelation nach Spearman“ sollte überprüft werden, ob die Meßwerte von intraarterieller DSA und PTA dem Einfluß unterschiedlicher Interventionsbedingungen unterlagen. Die festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit für den Spearman'schen Korrelationskoeffizienten (r) betrug $p = 0,05$. Es gingen die relativen prozentualen Differenzen, die zwischen den Werten der Abnahmezeitpunkte vor und unmittelbar nach bzw. vor und 4 h nach einem Eingriff bestanden, in die Berechnungen ein.

4.4.1 Einflüsse auf die relativen prozentualen vor-nach-Differenzen der Gruppe KM

4.4.1.1 Einfluß der KM-Menge

Zwischen den relativen vor-nach-Differenzen der Meßwerte der während der DSA entnommenen arteriellen und venösen Proben und der zugeführten KM-Menge existierte bei CD62 und CD63 sowie den Isotypkontrollen ex vivo (ohne Abb.) und in vitro (siehe Abb. 32, Abb. 33, Abb. 34, Abb. 35) kein signifikanter linearer Zusammenhang. Somit konnten wir eine Einwirkung der KM-Menge auf die Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten unmittelbar nach der DSA im Vergleich zum Beginn der Intervention nicht nachweisen.

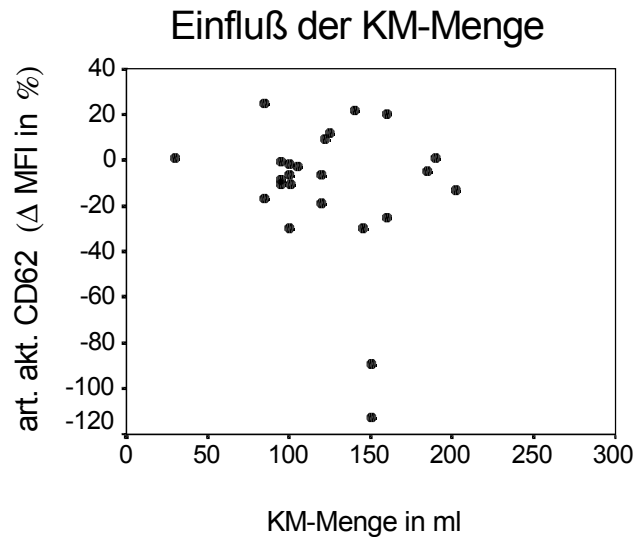


Abb. 32: **Einfluß der KM-Menge während der DSA auf CD62, aktiviert, arteriell** ($n = 24$); $r = -0,14$ (n. s.); Werte vor KM: [10,14]; Min.: 5,57; Max.: 37,52; Isotypkontrollen: $r = 0,07$ (n. s.)

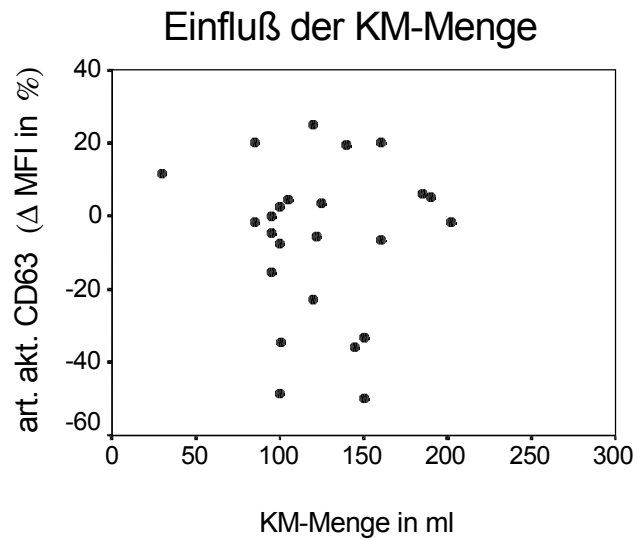


Abb. 33: **Einfluß der KM-Menge während der DSA auf CD63, aktiviert, arteriell (n = 24);** $r = -0,01$ (n. s.); Werte vor KM: [11,56]; Min.: 5,57; Max.: 29,43; Isotypkontrollen: $r = 0,07$ (n. s.)

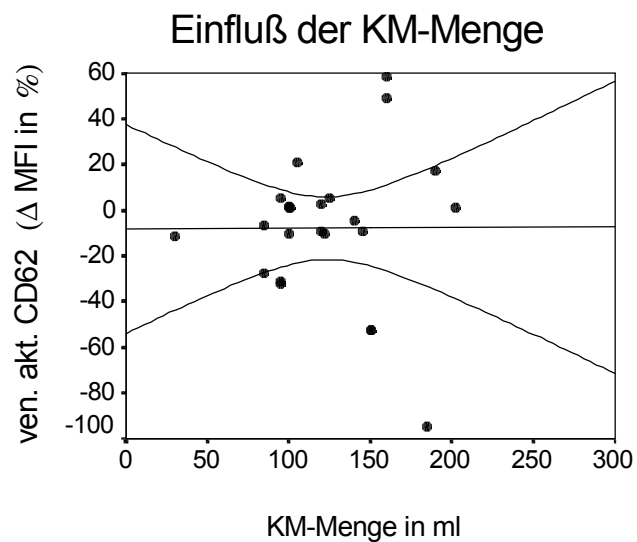


Abb. 34: **Einfluß der KM-Menge während der DSA auf CD62, aktiviert, venös (n = 24);** $r = 0,22$ (n. s.); Werte vor KM: [11,14]; Min.: 5,14; Max.: 37,52; Isotypkontrollen: $r = 0,14$ (n. s.)

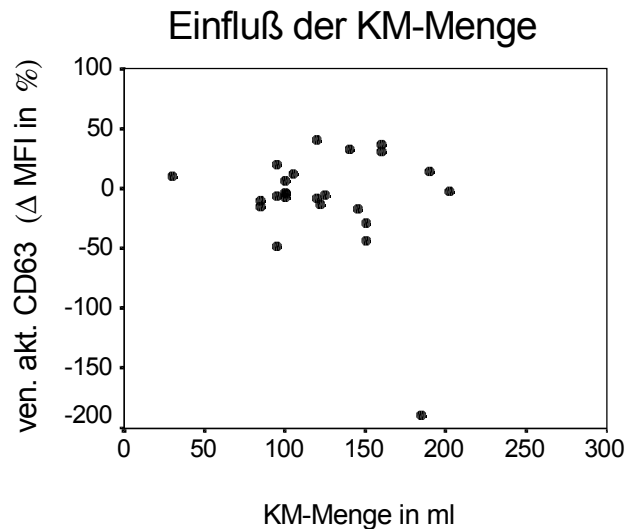


Abb. 35: **Einfluß der KM-Menge während der DSA auf CD63, aktiviert, venös** ($n = 24$); $r = 0,08$ (n. s.); Werte vor KM: [10,7]; Min.: 5,78; Max.: 28,9; Isotypkontrollen: $r = 0,14$ (n. s.)

4.4.1.2 Einfluß der Heparinmenge

Es bestand ein signifikanter negativer linearer Zusammenhang zwischen der während der DSA applizierten Heparinmenge und den relativen prozentualen vor-nach-Differenzen der Meßwerte der nativen venösen Proben bei CD62 ($n = 24$; $r = -0,47$; $p = 0,02$; Werte vor KM: Median: 4; Min.: 2,81; Max.: 6,44; Isotypkontrollen: $r = -0,28$, n. s.). Höhere Heparinmengen korrelierten mit kleineren bzw. negativen Differenzen. Demzufolge stieg die Relativzahl aktivierter Plättchen im lokalen Effluat direkt nach dem Eingriff in bezug auf das Ausgangsniveau um so stärker, je mehr Heparin während der DSA zugeführt wurde. Da die Meßwerte der übrigen nativen und der in vitro aktivierten Proben sowie der PTA (siehe 4.4.3.3 und 4.4.4.3) keinem beweisbaren Einfluß der Heparinmenge unterlagen, verzichteten wir auf eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse.

4.4.2 Einflüsse auf die relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen der Gruppe KM

4.4.2.1 Einfluß der KM-Menge

Es existierte ein signifikanter positiver linearer Zusammenhang zwischen der während der DSA zugeführten KM-Menge und den relativen vor-, und 4h-nach-Differenzen der Meßwerte der aktivierten, venösen, mit Anti-CD62 markierten Proben. Zunehmende KM-Mengen korrelierten mit größeren bzw. positiven Differenzen (siehe Abb. 38). Somit nahm die Relativzahl sensibilisierter Thrombozyten im lokalen Effluat zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA im Vergleich zu den Ausgangswerten mit steigenden KM-Mengen ab. Die Werte der übrigen mit Anti-CD62 und -CD63 markierten in vitro aktivierten (siehe Abb.

36, Abb. 37, Abb. 39) und nativen Proben (ohne Abb.) sowie sämtlicher Isotypkontrollen korrelierten nicht signifikant mit der KM-Menge.

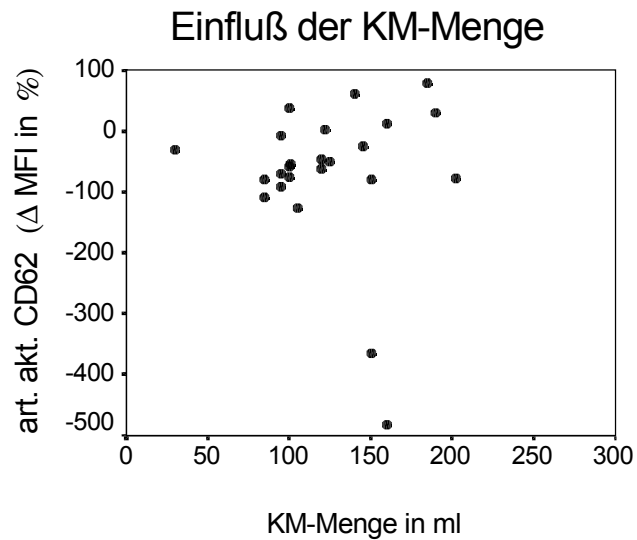


Abb. 36: **Einfluß der KM-Menge während der DSA auf CD62, aktiviert, arteriell (n = 24)**; $r = 0,19$ (n. s.); Werte vor KM: [10,14]; Min.: 5,57; Max.: 37,52; Isotypkontrollen: $r = -0,03$ (n. s.)

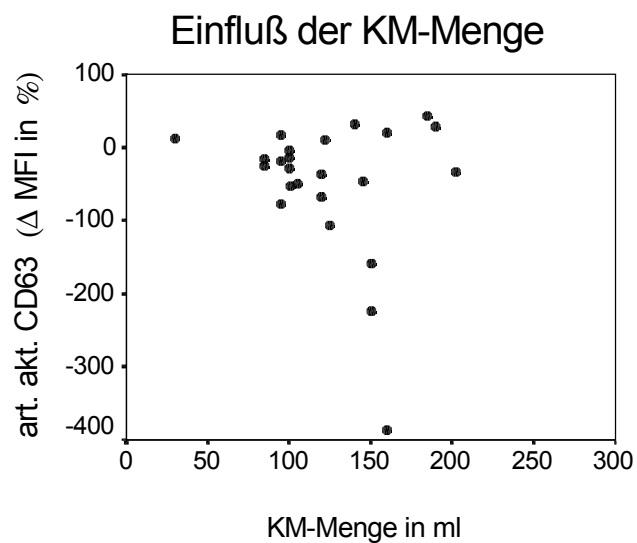


Abb. 37: **Einfluß der KM-Menge während der DSA auf CD63, aktiviert, arteriell (n = 24)**; $r = -0,06$ (n. s.); Werte vor KM: [11,56]; Min.: 5,57; Max.: 29,43; Isotypkontrollen: $r = -0,03$ (n. s.)

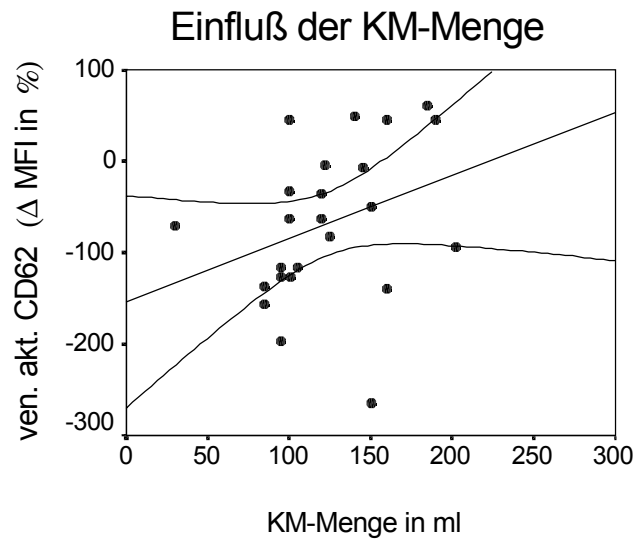


Abb. 38: **Einfluß der KM-Menge während der DSA auf CD62, aktiviert, venös (n = 24);** $r = 0,42$ ($p = 0,04$); Werte vor KM: [11,14]; Min.: 5,14; Max.: 37,52; Isotypkontrollen: $r = 0,04$ (n. s.)

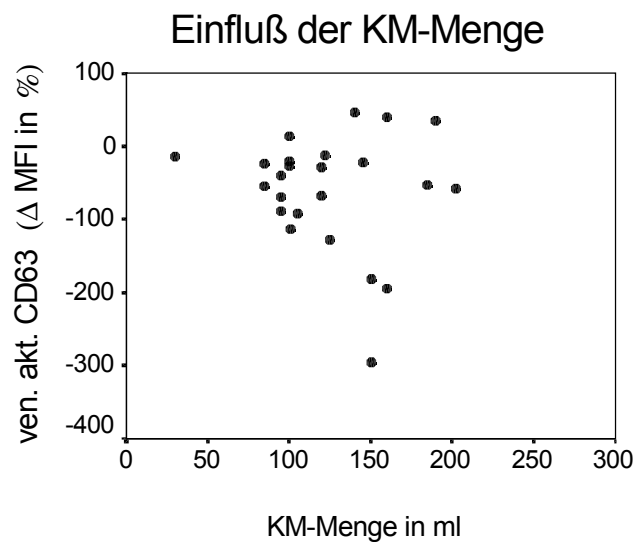


Abb. 39: **Einfluß der KM-Menge während der DSA auf CD63, aktiviert, venös (n = 24);** $r = -0,07$ (n. s.); Werte vor KM: [10,7]; Min.: 5,78; Max.: 28,9; Isotypkontrollen: $r = 0,04$ (n. s.)

4.4.2.2 Einfluß der Heparinmenge

Es zeigte sich ein signifikanter negativer linearer Zusammenhang zwischen der während der DSA der applizierten Heparindosis und den relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen der Meßwerte der nativen venösen Proben bei CD63 ($n = 24$; $r = -0,42$; $p = 0,04$; Werte vor KM: Median: 5,88; Min.: 4,03; Max.: 8,74; Isotypkontrollen: $r = -0,15$, n. s.). Steigende Heparinmengen korrelierten mit kleineren bzw. negativen Differenzen. Somit nahm die Relativzahl aktivierter Plättchen im lokalen Effluat 4h nach dem Eingriff in bezug auf die Ausgangswerte mit höheren zugeführten Heparindosen zu. Da die Meßwerte der übrigen nativen und der in vitro aktivierten Proben sowie der PTA keinem beweisbaren Einfluß der Heparinmenge unterlagen (siehe 4.4.3.3 und 4.4.4.3), verzichteten wir auch hier auf die graphische Darstellung der Ergebnisse.

4.4.3 Einflüsse auf die relativen prozentualen vor-nach-Differenzen der Gruppe PTA

4.4.3.1 Einfluß der KM-Menge

Es bestand ein nachweisbarer signifikanter positiver linearer Zusammenhang zwischen der KM-Menge und den relativen prozentualen vor-nach-Differenzen der Meßwerte der nativen arteriellen Proben bei CD62 und CD63 (siehe Abb. 40, Abb. 41). Große KM-Mengen bewirkten ein Ansteigen der Differenzen und damit eine Verringerung der Relativzahl aktivierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation direkt nach der PTA im Vergleich zum Beginn der Intervention. Anhand der mit Anti-CD62 und -CD63 markierten nativen venösen (siehe Abb. 42, Abb. 43) und in vitro aktivierten Proben (ohne Abb.) sowie sämtlicher Isotypkontrollen konnte eine lineare Abhängigkeit der Meßwerte von der KM-Menge nicht bewiesen werden.

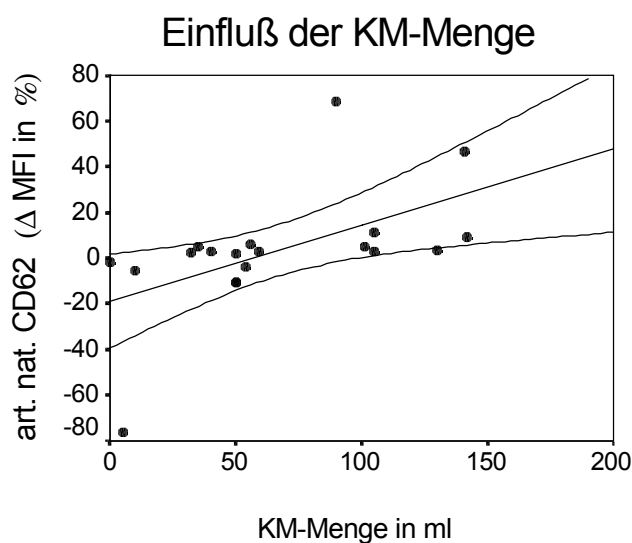


Abb. 40: **Einfluß der KM-Menge während der PTA auf CD62, nativ, arteriell ($n = 20$); $r = 0,71$ ($p = 0,001$); Werte vor PTA: [4,43]; Min.: 2,86; Max.: 14,59; Isotypkontrollen: $r = 0,09$ (n. s.)**

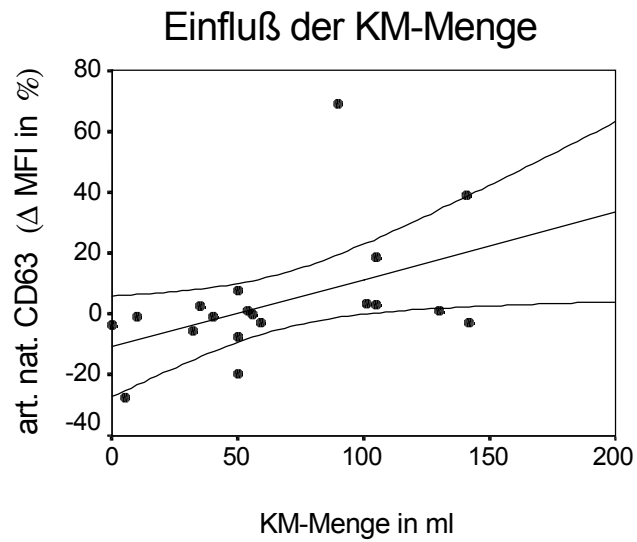


Abb. 41: **Einfluß der KM-Menge während der PTA auf CD63, nativ, arteriell** ($n = 20$); $r = 0,56$ ($p = 0,01$); Werte vor PTA: [5,6]; Min.: 4,61; Max.: 17; Isotypkontrollen: $r = 0,09$ (n. s.)

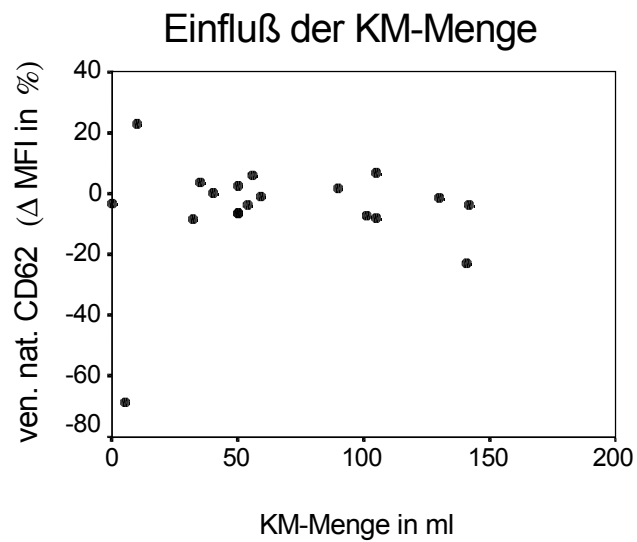


Abb. 42: **Einfluß der KM-Menge während der PTA auf CD62, nativ, venös** ($n = 20$); $r = -0,08$ (n. s.); Werte vor PTA: [4,07]; Min.: 3,11; Max.: 10,84; Isotypkontrollen: $r = -0,01$ (n. s.)

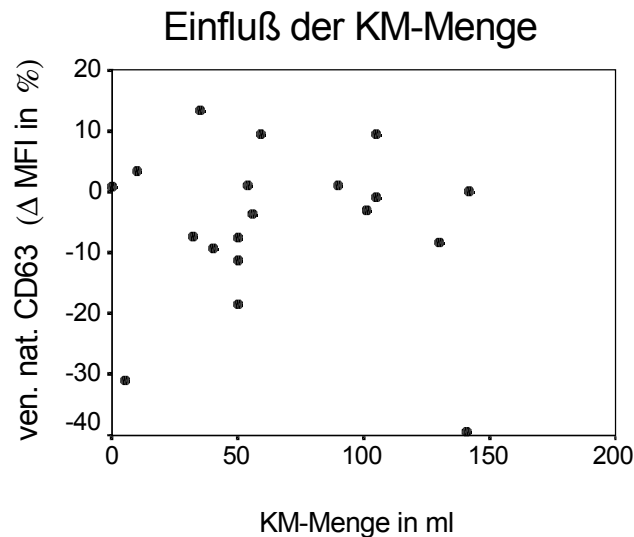


Abb. 43: **Einfluß der KM-Menge während der PTA auf CD63, nativ, venös** (n = 20); $r = 0,01$ (n. s.); Werte vor PTA: [5,5]; Min.: 4,61; Max.: 9,31; Isotypkontrollen: $r = -0,01$ (n. s.)

4.4.3.2 Einfluß der Dilatation

Die Gefäßläsion durch die PTA hängt sowohl von der Zeitdauer einer Dilatation als auch von der Länge des Ballons ab. Beide Faktoren sind sehr variabel und gingen als Produkt in den Dilatationsindex (Einheit: s x cm) ein, welcher für die Berechnungen der Einflußnahme der Dilatation auf die Meßwerte der PTA zum Einsatz kam. Bei Interventionen mit mehr als einer zu dilatierenden Stenose bzw. Verschlußstrecke wurde ein Gesamtindex aus der Summe der für die einzelnen Dilatationsorte errechneten Indexe gebildet. Die angewendeten Dilatationsdrücke und Ballondurchmesser gingen nicht in die Berechnungen ein, da sie sich aufgrund ähnlicher Eigenschaften und Volumina der dilatierten Gefäße nur sehr geringfügig voneinander unterschieden.

Zwischen dem Dilatationsindex und den relativen prozentualen vor-nach-Differenzen der Meßwerte der nativen arteriellen Proben bestand bei CD62 und CD63, nicht jedoch bei den Isotypkontrollen, ein nachweisbarer signifikanter positiver linearer Zusammenhang (siehe Abb. 44, Abb. 45). Steigende Indexe machten sich in einem Anwachsen der Differenzen und demzufolge in einer Verminderung des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation direkt nach der PTA im Vergleich zum Beginn des Eingriffs bemerkbar.

Anhand der nativen venösen (siehe Abb. 46, Abb. 47) und der in vitro aktivierten (ohne Abb.) Proben konnte bei CD62 und CD63 sowie bei den Isotypkontrollen eine lineare Abhängigkeit der Meßwerte vom Dilatationsindex nicht nachgewiesen werden.

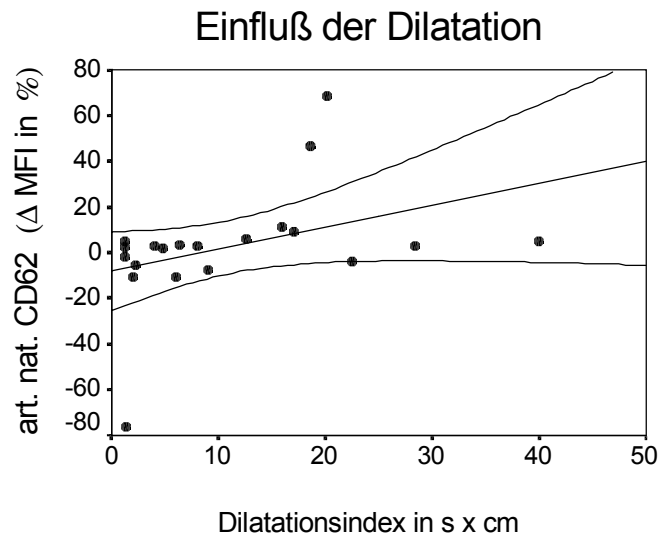


Abb. 44: **Einfluß der Dilatation während der PTA auf CD62, nativ, arteriell (n = 20);** $r = 0,49$ ($p = 0,03$); Werte vor PTA: [4,43]; Min.: 2,86; Max.: 14,59; Isotypkontrollen: $r = 0,06$ (n. s.)

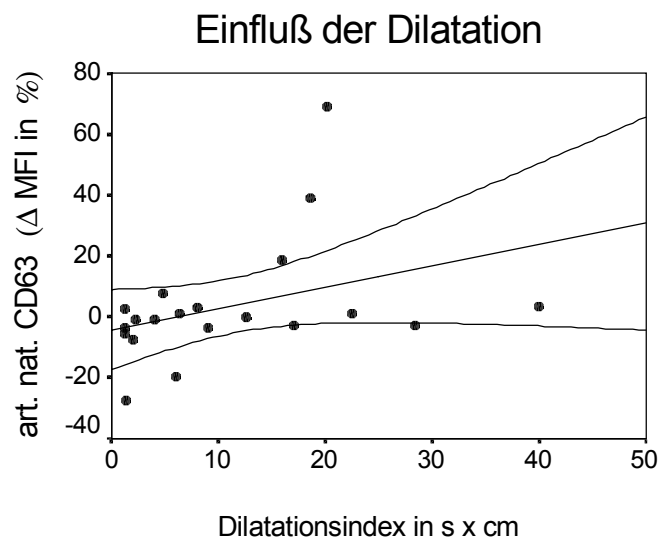


Abb. 45: **Einfluß der Dilatation während der PTA auf CD63, nativ, arteriell (n = 20);** $r = 0,5$ ($p = 0,02$); Werte vor PTA: [5,6]; Min.: 4,61; Max.: 17; Isotypkontrollen: $r = 0,06$ (n. s.)

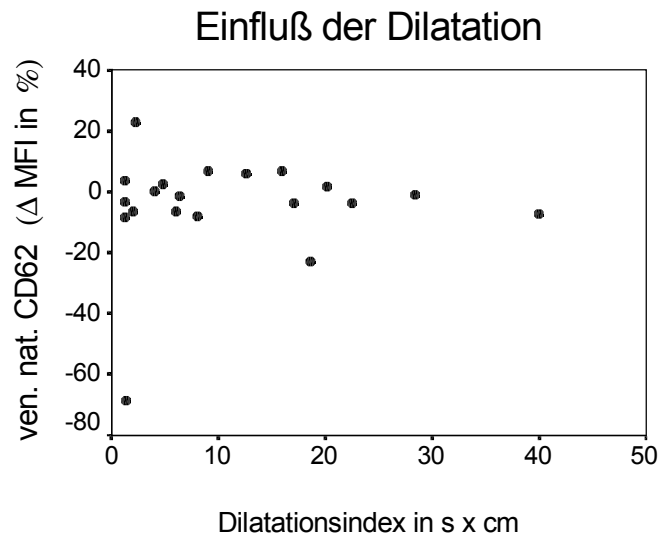


Abb. 46: **Einfluß der Dilatation während der PTA auf CD62, nativ, venös (n = 20);** $r = 0,02$ (n. s.);
Werte vor PTA: [4,07]; Min.: 3,11; Max.: 10,84; Isotypkontrollen: $r = 0,12$ (n. s.)

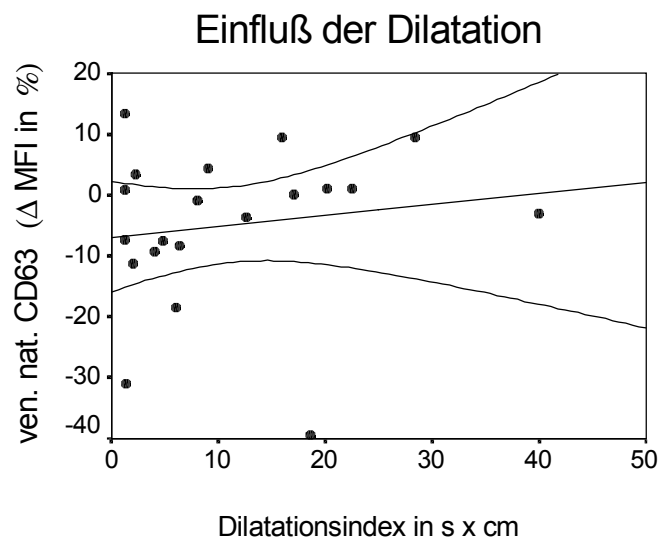


Abb. 47: **Einfluß der Dilatation während der PTA auf CD63, nativ, venös (n = 20);** $r = 0,2$ (n. s.);
Werte vor PTA: [5,5]; Min.: 4,61; Max.: 9,31; Isotypkontrollen: $r = 0,12$ (n. s.)

4.4.3.3 Einfluß der Heparinmenge

Zwischen der während der PTA applizierten Heparindosis und den relativen prozentualen vor-nach-Differenzen der Meßwerte der nativen und in vitro aktivierten Proben bestand weder bei den Markern CD62 und CD63 noch bei den Isotypkontrollen ein signifikanter linearer Zusammenhang (ohne Abb.). Demzufolge konnten wir einen Einfluß der Heparinmenge auf die Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Plättchen in der systemischen arteriellen Zirkulation und im lokalen Effluat unmittelbar nach der PTA in bezug auf die Ausgangswerte nicht nachweisen.

4.4.4 Einflüsse auf die relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen der Gruppe PTA

4.4.4.1 Einfluß der KM-Menge

Es existierte ein beweisbarer signifikanter negativer linearer Zusammenhang zwischen der KM-Menge und den relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen der Meßwerte der venösen nativen Proben bei CD62, nicht jedoch bei CD63 (siehe Abb. 50, Abb. 51). Die Meßwerte der mit Anti-CD62 und -CD63 markierten nativen arteriellen (siehe Abb. 48, Abb. 49) und in vitro aktivierten Proben (ohne Abb.) sowie sämtlicher Isotypkontrollen korrelierten nicht signifikant mit der KM-Menge. Somit erschienen im lokalen Effluat mit steigender KM-Menge vermehrt aktivierte Thrombozyten. Der Einfluß des KM auf den prozentualen Anteil aktivierter Plättchen in der systemischen arteriellen Zirkulation (siehe 4.4.3.1) war 4 h nach der PTA nicht mehr erkennbar.

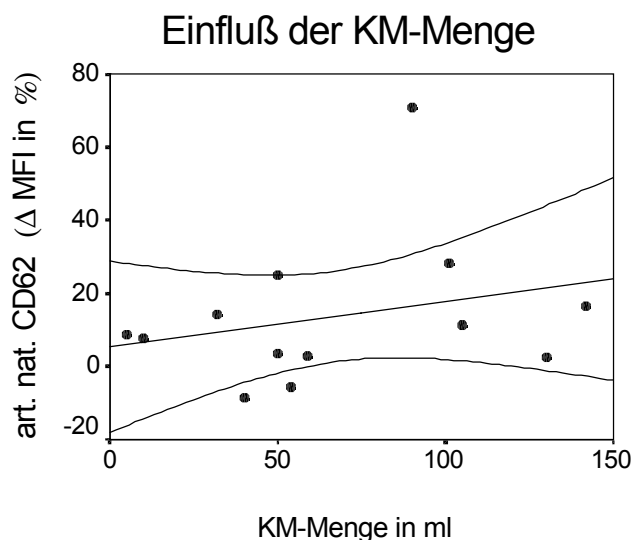


Abb. 48: **Einfluß der KM-Menge während der PTA auf CD62, nativ, arteriell** (n = 14); $r = 0,21$ (n. s.); Werte vor PTA: [4,43]; Min.: 2,86; Max.: 14,59; Isotypkontrollen: $r = -0,3$ (n. s.)

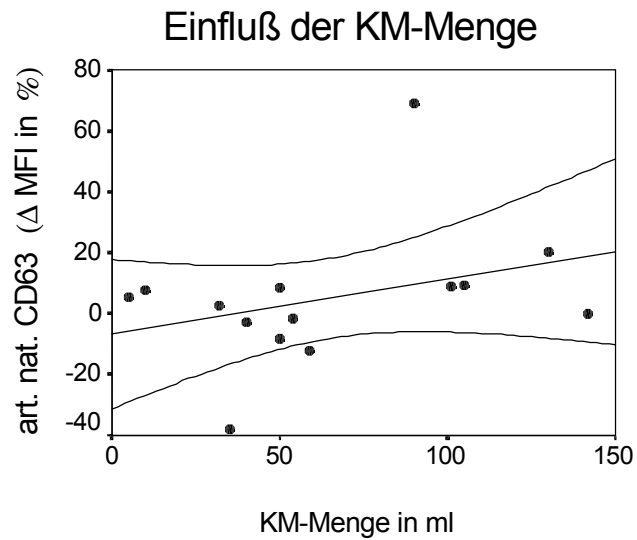


Abb. 49: **Einfluß der KM-Menge während der PTA auf CD63, nativ, arteriell (n = 15);** $r = 0,37$ (n. s.); Werte vor PTA: [5,6]; Min.: 4,61; Max.: 17; Isotypkontrollen: $r = -0,3$ (n. s.)

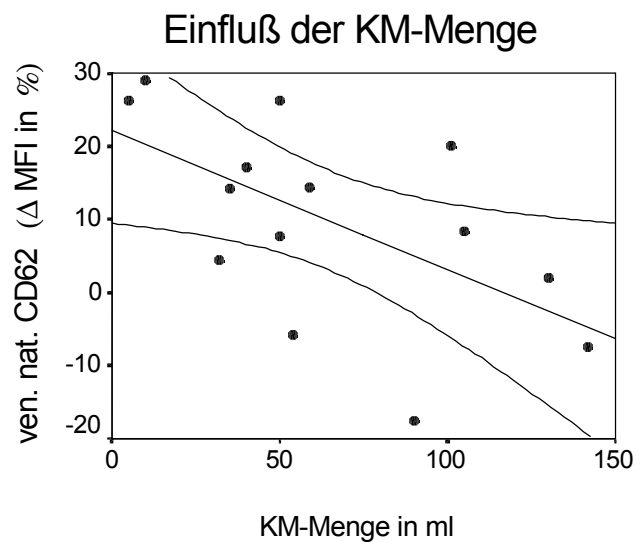


Abb. 50: **Einfluß der KM-Menge während der PTA auf CD62, nativ, venös (n = 15);** $r = -0,57$ ($p = 0,03$); Werte vor PTA: [4,07]; Min.: 3,11; Max.: 10,84; Isotypkontrollen: $r = -0,15$ (n. s.)

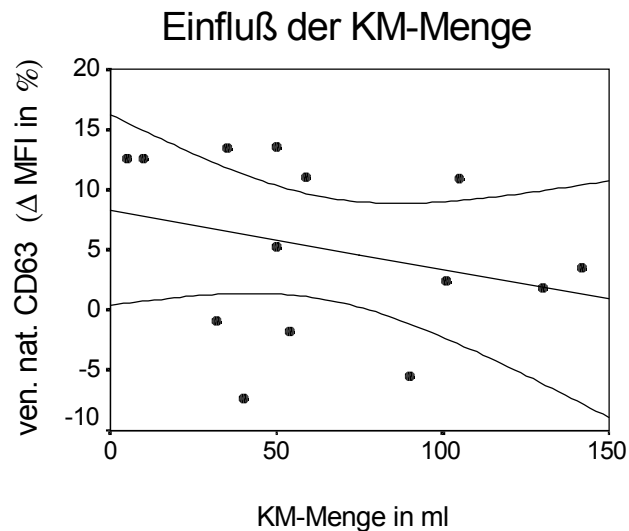


Abb. 51: **Einfluß der KM-Menge während der PTA auf CD63, nativ, venös (n = 15)**; $r = -0,31$ (n. s.); Werte vor PTA: [5,5]; Min.: 4,61; Max.: 9,31; Isotypkontrollen: $r = -0,15$ (n. s.)

4.4.4.2 Einfluß der Dilatation

Die Dilatation übte auf die relativen prozentualen Differenzen, die zwischen den Meßwerten der nativen Proben zum Zeitpunkt vor und 4 h nach der PTA bei den Markern CD62 und CD63 sowie den Isotypkontrollen bestanden, keinen nachweisbaren Einfluß aus (siehe Abb. 52, Abb. 53, Abb. 54, Abb. 55). Ferner konnte kein Zusammenhang zwischen dem Dilatationsindex und den Meßwerten der in vitro aktivierten Proben (ohne Abb.) bewiesen werden. Damit zeigte sich, daß die oben beschriebene Einwirkung des Dilatationsindex auf die Relativzahl aktivierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation (siehe 4.4.3.2) zum Zeitpunkt 4 h nach der PTA nicht mehr bestätigt werden konnte.

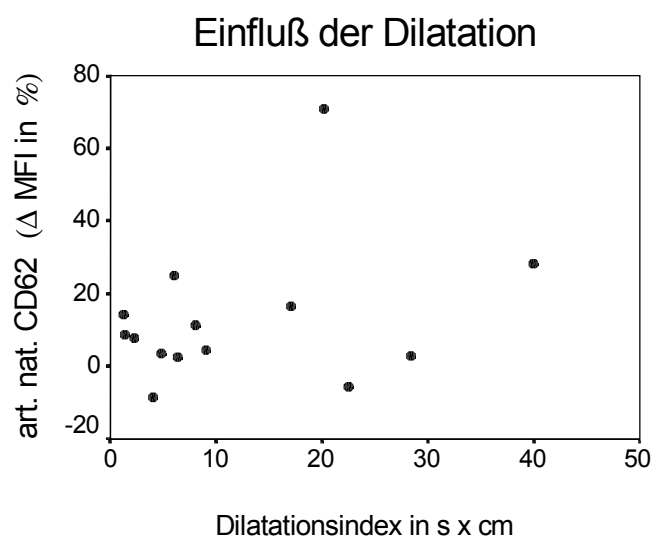


Abb. 52: **Einfluß der Dilatation während der PTA auf CD62, nativ, arteriell (n = 14)**; $r = 0,13$ (n. s.); Werte vor PTA: [4,43]; Min.: 2,86; Max.: 14,59; Isotypkontrollen: $r = -0,42$ (n. s.)

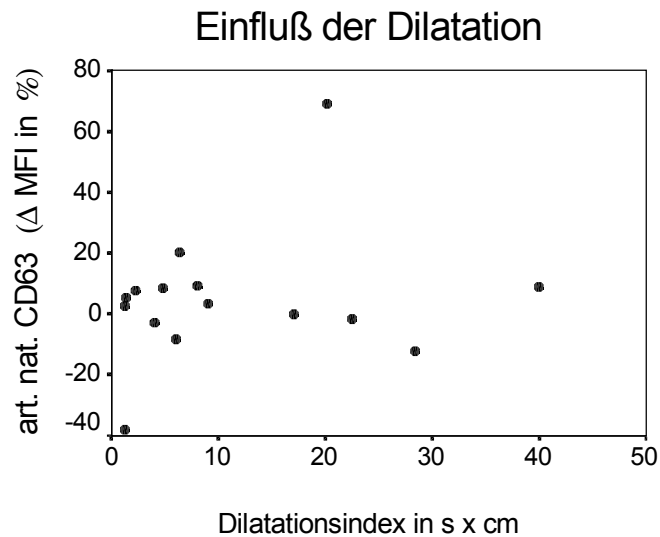


Abb. 53: **Einfluß der Dilatation während der PTA auf CD63, nativ, arteriell (n = 15);** $r = 0,19$ (n. s.); Werte vor PTA: [5,6]; Min.: 4,61; Max.: 17; Isotypkontrollen: $r = -0,42$ (n. s.)

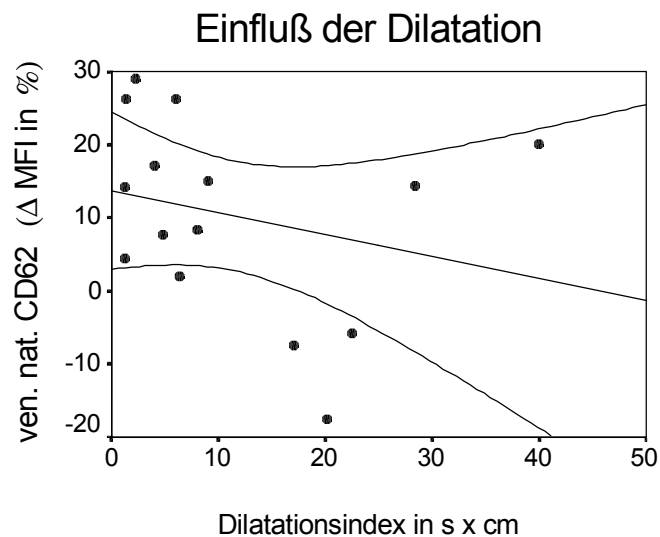


Abb. 54: **Einfluß der Dilatation während der PTA auf CD62, nativ, venös (n = 15);** $r = -0,29$ (n. s.); Werte vor PTA: [4,07]; Min.: 3,11; Max.: 10,84; Isotypkontrollen: $r = -0,29$ (n. s.)

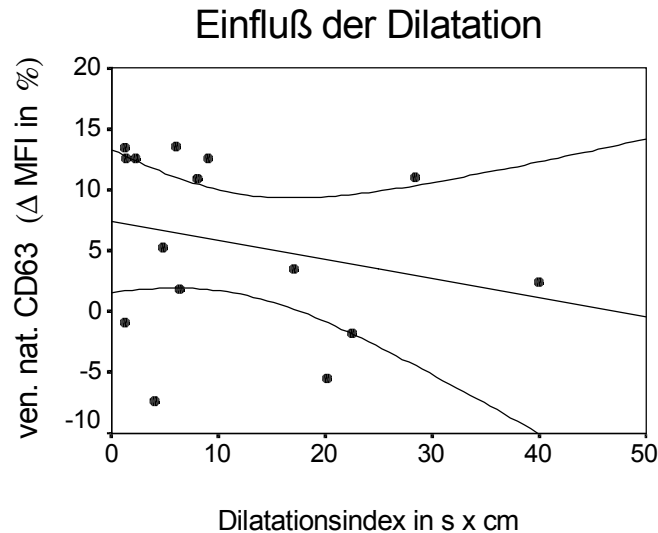


Abb. 55: **Einfluß der Dilatation während der PTA auf CD63, nativ, venös (n = 15);** $r = -0,3$ (n. s.); Werte vor PTA: [5,5]; Min.: 4,61; Max.: 9,31; Isotypkontrollen: $r = -0,29$ (n. s.)

4.4.4.3 Einfluß der Heparinmenge

Auch zwischen der während der PTA applizierten Heparinmenge und den relativen prozentualen vor-, und 4h-nach-Differenzen der Meßwerte der nativen und in vitro aktivierten Proben existierte weder bei den Markern CD62 und CD63 noch bei den Isotypkontrollen ein signifikanter linearer Zusammenhang (ohne Abb.). Demzufolge ließ sich ein Einfluß der Heparinmenge auf den prozentualen Anteil aktivierter und sensibilisierter Plättchen in der systemischen arteriellen Zirkulation und im lokalen Effluat auch 4 h nach der PTA in bezug auf die Ausgangswerte nicht nachweisen.

5 Diskussion

In dieser Studie untersuchten wir die Aktivierung und Sensibilität zirkulierender Thrombozyten bei gesunden Probanden und bei PAVK-Patienten sowie im Rahmen der Interventionen DSA und PTA im Bereich der unteren Extremitäten. Dabei analysierten wir die Plättchenaktivierung ex vivo und in vitro mit der Methode der Durchflußzytometrie und einer statistischen Auswertung von Meß- und Interventionsdaten verschiedener Patientengruppen.

Wir fanden heraus, daß Patienten mit PAVK signifikant mehr aktivierte und sensibilisierte Plättchen als gesunde Probanden aufwiesen. Die Methode der Blutentnahme aus arteriellen und venösen Schleusen übte im Vergleich zur peripheren Venenpunktion keinen nachweisbaren Einfluß auf unsere Ergebnisse aus. Wir beobachteten zum Zeitpunkt 4 h nach den Interventionen DSA und PTA signifikante Änderungen in der Aktivität und Sensibilität der Thrombozyten. Nachweisbare Unterschiede in der Plättchenaktivierung zwischen dem arteriellen und venösen Strombereich ließen sich jedoch zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht aufzeigen. Beim Vergleich der Interventionen PTA und DSA ergab sich direkt nach den Eingriffen eine signifikante Differenz in der Thrombozytenaktivierung. Schließlich belegten wir den signifikanten Einfluß verschiedener Interventionsbedingungen auf die Aktivierung und Sensibilität der Plättchen.

Bei der Analyse unserer Meßdaten fiel auf, daß die statistisch belegten Unterschiede besonders bei den Vergleichen innerhalb der Gruppen sehr geringe Beträge aufwiesen. Für die Einschätzung der klinischen Bedeutung unserer Ergebnisse müßten sensiblere Methoden entwickelt werden, die z. B. die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten erfassen können.

5.1 Vergleiche mit den Kontrollgruppen

5.1.1 Vergleich zwischen den Gruppen KG1 und KG2

In der Gruppe KG1 waren Patienten mit einer PAVK ohne interventionelle Manipulationen (DSA, PTA) zusammengefaßt, während die Gruppe KG2 aus gesunden Probanden bestand. Bei beiden Gruppen fand die Abnahme der Blutproben unter denselben Bedingungen aus einer peripheren Vene statt. Ein Vergleich zwischen diesen Gruppen wurde durchgeführt, um Aussagen über die systemische Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit PAVK und bei Normalprobanden treffen zu können.

Thrombozyten von Patienten mit einer KHK unterschieden sich von Plättchen gesunder Probanden durch eine verstärkte Expression der Aktivierungsantigene CD62 und GP53 sowie des Rezeptors GPIIb/IIIa in seiner funktionellen Form [10, 59].

In dieser Studie beobachteten wir, daß Patienten mit PAVK einen signifikant höheren systemischen prozentualen Anteil aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten aufwiesen als gesunde Probanden (siehe 4.1.1).

Die Gruppen KG1 und KG2 differierten nicht nur hinsichtlich der PAVK, sondern auch in einigen aus den Anamnesen entnommenen Daten (siehe 3.2):

5.1.1.1 Alter der Patienten

Alle Gruppen mit PAVK hatten per se eine homogene Altersverteilung, nur die Gruppe KG2 war etwas jünger. Das beeinflußt die Aussagen und klinische Relevanz dieser Studie nicht, da das Alter für die Primär- und auch Spätergebnisse einer PTA nur eine geringe Bedeutung hat: Der Vergleich der Langzeitergebnisse nach erfolgreicher PTA in Abhängigkeit vom Alter ließ eine statistische Signifikanz nur zwischen Patienten unter 50 und über 70 Jahren erkennen [92].

5.1.1.2 ASS-Einfluß

Die medikamentöse Behandlung mit ASS ist eine Standardtherapie der PAVK, welcher alle betroffenen Patienten dieser Studie, außer bei Kontraindikationen, unterzogen wurden.

ASS hatte in Dosen von 160 mg/d bis 300 mg/d in vivo und in vitro weder auf die Expression von CD62 und CD63 noch auf die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten einen Einfluß [14, 39]. Mit der Azetylierung der Zyklooxygenase und der daraus folgenden Hemmung der Thromboxan A₂-Bildung war ASS nicht in der Lage, stärkere thrombozytenaktivierende Stimuli wie die Einwirkung von Thrombin oder Kollagen an verletzten Gefäßwänden zu unterdrücken [14]. Auch die hämostatischen und präthrombotischen Plättchenfunktionen verhielten sich resistent gegenüber ASS [73]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß dieses Medikament keinen Einfluß auf das Verhalten der Thrombozyten gegenüber hohen Schergeschwindigkeiten [42] und auf die Plättchenaggregation während einer PTA hatte [56].

Somit ist anzunehmen, daß zwischen den Meßergebnissen dieser Studie und der Einnahme von ASS kein Zusammenhang bestand.

5.1.1.3 Lipoproteine

Eine Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie waren in den Patientengruppen mit PAVK stärker vertreten als in der Normalgruppe KG2.

Zirkulierende Lipoproteine konnten eine Adhäsion von Thrombozyten in vitro verursachen, wobei VLDL stärker wirkte als HDL und LDL. Vermutlich wurde dieser Vorgang durch den Integrin-Oberflächenrezeptor der Plättchen GPIIb/IIIa ermöglicht [44]. Außerdem verhinderte eine Hypercholesterinämie die Thrombozyten- und ADP-induzierte endothelabhängige Relaxation in Koronararterien des

Schweins [84]. Angioplastisch geschädigte Arterienwände von Kaninchen mit einer Hypercholesterinämie zeigten im Vergleich zu Kaninchen ohne Fettstoffwechselstörungen eine gesteigerte Expression des GP Thrombospondin-1, welches nach Gefäßverletzungen synthetisiert wird und eine funktionelle Rolle bei der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, der Aktivierung von Plasmin sowie bei der Angiogenese spielt [69]. Patienten mit einer Hypercholesterinämie wiesen, wahrscheinlich bedingt durch endotheliale Dysfunktionen und eine persistierende Thrombozytenaktivierung, höhere Werte zirkulierenden P-Selectins (P-Selectin, welches sich von der Zellmembran gelöst hat) auf als gesunde Probanden [20]. Insbesondere bei Patienten mit einer Hypercholesterinämie und begleitender Erhöhung der Plasma-Triglyzeride konnte, verglichen mit Kontrollprobanden, eine intensivere Thromboxan-Synthese und Plättchensekretion nachgewiesen werden [9].

Diese Prozesse können das Fortschreiten der Arteriosklerose beschleunigen und ursächlich für die Unterschiede zwischen den Gruppen KG1 und KG2 sein.

5.1.1.4 *Nikotinabusus*

Das Rauchen ist der wichtigste Risikofaktor für die PAVK und KHK.

Anhand eines Modells, in dem eine physiologische Blutzirkulation unter den Bedingungen von Gefäßstenosen und Intimaeinrissen simuliert wurde, konnte man nachweisen, daß bei Patienten mit KHK nach dem Rauchen von Zigaretten die Thromboseneigung von Thrombozyten akut zunahm. Weiterhin war nach dem Rauchen eine stärkere Plättchenaggregation nach Thrombinstimulation trotz ASS-Therapie zu beobachten. Die Freisetzung endogener Katecholamine, eine vermehrte Thromboxan-Synthese der Thrombozyten und eine erhöhte Empfindlichkeit der Plättchen gegenüber Agonisten wurden dafür verantwortlich gemacht [34]. Bei KHK-Patienten mit Hypertriglyzeridämie oder Hypercholesterinämie und niedrigen HDL-Werten verstärkte das Rauchen die spontane und die durch ADP induzierte Thrombozytenaggregation [63].

Diese Beobachtungen könnten eine Ursache für die höhere Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten in der PAVK-Gruppe KG1 gegenüber der Normalgruppe KG2 darstellen.

5.1.1.5 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus war in dieser Studie aus folgenden Gründen ein Ausschlußkriterium für die Auswahl der Probanden der Normalgruppe KG2:

Bei dieser Krankheit bewirken hyperaktive Thrombozyten an verletzten Endothelschichten zusammen mit einer erhöhten Verfügbarkeit thrombogener Agonisten und einer eingeschränkten Funktion von Gerinnungshemmern sowie des fibrinolytischen Systems einen hyperkoagulablen Status der Patienten. Die hyperaktiven Plättchen sind die Hauptkomponente des prätrombotischen Geschehens, da sie Mikroem-

bolisationen von Kapillaren verursachen, lokale Gefäßläsionen ausdehnen und akute arterielle Thrombosen auslösen. Bei Diabetikern zirkulieren große Thrombozyten mit intensiver Thromboxan-Synthese und einem hohen Gehalt an plättchenspezifischen Proteinen und zytoadhäsiven Oberflächenrezeptoren (GPIIb und GPIIb/IIIa), wobei die Gesamtplättchenzahl meist im normalen Bereich liegt. Die Ursache dafür könnte in einer Änderung der megakaryozytären Thrombopoese bestehen.

Anhand gesteigerter Expression von CD62 und CD63 wurde gezeigt, daß Patienten mit Diabetes mellitus stärker aktivierte Plättchen als gesunde Probanden aufwiesen [82]. Die vermehrte Aktivierung war schon in frühen Stadien der Krankheit, bei noch nicht apparenten vaskulären Läsionen, beweisbar [80, 81]. Bei Patienten in der Initialphase der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I waren höhere Werte zirkulierenden P-Selectins meßbar als bei Kontrollprobanden [43].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich die Unterschiede im Alter und der ASS-Medikation zwischen den Gruppen nicht auf die Ergebnisse dieser Studie auswirken. Die Risikofaktoren für eine PAVK Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus haben jedoch einen Einfluß auf die Plättchenfunktionen und waren in der Gruppe KG1 sowie den anderen PAVK-Gruppen gegenüber der Gruppe gesunder Probanden erhöht. Die hohe Anzahl von Risikofaktoren könnte eine Ursache für die in unserer Studie nachgewiesene systemisch gesteigerte Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten bei Patienten mit PAVK gegenüber gesunden Probanden darstellen. Möglicherweise forcieren diese Thrombozyten aufgrund ihrer vermehrten Aktivierung und verstärkten Reaktion auf Aktivierungsreize die Genese der PAVK.

5.1.2 Vergleich der Gruppe KG1 mit den Gruppen KM und PTA

Thrombozyten werden durch einen Kontakt mit verschiedenen körperfremden Materialien in ihrer Funktion beeinflusst. Das Wachstum von Plättchenthromben auf Fremdkörperoberflächen ist ein Resultat der Adhäsion einer ersten Thrombozytenschicht und einer darauf folgenden Paradhäsion und Supradhäsion von immer mehr Schichten von Thrombozyten. Der Rezeptor GPIIb/IIIa ist verantwortlich für die Adhäsion der ersten Schicht, die Paradhäsion wird durch die Interaktion von GPIb mit vWF verursacht, während der Mechanismus der Supradhäsion noch unbekannt ist [23, 26]. Außerdem wurde eine erhöhte Expression von CD62 und CD63 bei Plättchen beobachtet, die mit verschiedenen Materialien in Berührung kamen [25, 65].

Bei Untersuchungen der Thrombozytenaktivierung ist es aufgrund dieser Beobachtungen wichtig zu wissen, ob die Abnahmemethode durch den Kontakt des Blutes mit dem Abnahmebesteck zu einer artifiziellen Aktivierung der Plättchen führt. Es wurde gezeigt, daß die Verwendung heparinisierter Katheter keine Thrombozytenaktivierung verursachte [2, 71].

In dieser Studie führten wir einen Vergleich zwischen zwei verschiedenen Patientengruppen durch, um die Abhängigkeit der Abnahmemethode auf die Plättchenaktivierung zu untersuchen:

Die Gruppe KG1 umfaßte Patienten mit PAVK ohne interventionelle Manipulationen durch eine intraarterielle DSA oder PTA, bei denen die Blutabnahme aus der Cubitalvene mit einer Kanüle erfolgte. In den beiden Gruppen KM und PTA waren Patienten mit PAVK zusammengefaßt, denen vor und unmittelbar nach den Eingriffen DSA bzw. PTA sowie 4 Stunden später Blutproben aus Schleusen entnommen wurden. Für den Vergleich wurden die aus den peripheren Abnahmen stammenden Blutproben der Gruppe KG1 und die jeweils aus den venösen Schleusen vor den Interventionen entnommenen Blutproben der Gruppen KM und PTA herangezogen. Anhand dieses Vergleichs war es möglich, den Einfluß der Abnahmemethode auf den prozentualen Anteil aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten in den Blutproben zu beurteilen.

Es stellte sich heraus, daß zwischen den mit einer Kanüle entnommenen und den aus einer venösen Schleuse stammenden Blutproben keine signifikanten Unterschiede in der Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten bestanden (siehe 4.1.2). Das bedeutet, daß sich die Gewinnung der Blutproben aus Schleusen im Vergleich zur Entnahme mittels Kanüle nicht nachweisbar auf den prozentualen Anteil aktivierter und sensibilisierter Plättchen auswirkte und somit ein Einfluß der Abnahmemethode auf die Thrombozytenaktivierung nicht belegt werden konnte.

Dieses Ergebnis spricht im Zusammenhang mit der durchgeführten Aufbereitungs- und Fixierungsmethode für die Eignung von sich in unmittelbarer Nähe zum manipulierten Gefäßabschnitt befindenden Schleusen zur Probenentnahme, um den Zustand der Thrombozyten während der intraarteriellen DSA und PTA ex vivo und in vitro zu untersuchen.

5.2 Vergleiche innerhalb der Gruppen KM und PTA

Den Gruppen KM und PTA gehörten Patienten mit PAVK an, denen vor und direkt nach den Eingriffen intraarterielle DSA bzw. PTA sowie 4 Stunden später Blutproben aus arteriellen und venösen Schleusen entnommen wurden. Wir führten einen Vergleich zwischen den Proben verschiedener Abnahmezeitpunkte durch, um den Einfluß der jeweiligen Intervention auf die Thrombozytenaktivierung zu beurteilen. Die Proben aus dem arteriellen und venösen Stromgebiet wurden miteinander verglichen, um herauszufinden, ob Unterschiede in der Thrombozytenaktivierung zwischen den Gefäßabschnitten bestanden, die dem Ort der Manipulation vor- und nachgeschaltet waren.

Die venösen Werte charakterisierten in beiden Gruppen die Eigenschaften der Thrombozyten im lokalen Effluat des manipulierten Gefäßabschnittes. Aufgrund der verschiedenen Punktionsrichtungen kennzeichneten die arteriellen Werte der Gruppe PTA die Plättcheneigenschaften in der systemischen arteriellen

Zirkulation, während die arteriellen Werte der Gruppe KM diese Eigenschaften am Beginn des manipulierten arteriellen Stromgebietes beschrieben.

5.2.1 Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM

Den wichtigsten Einflußfaktor auf die Meßergebnisse dieser Gruppe stellte das KM dar. Zur Anwendung kamen die nichtionischen niederosmolaren Präparate Ultravist 300 (Iopromid) und Solutrast 370 (Iopamidol). Beide gehören zur Gruppe der trijodierten nichtionischen Monomere. Nichtionische niederosmolare KM werden bevorzugt verwendet, da sie eine geringere molekulare Toxizität und einen höheren Wirkungsindex aufweisen als ionische Präparate [22]. Außerdem verursachen sie weniger Nebenwirkungen wie lokale Schmerzen und Wärmegefühle, Übelkeit und Erbrechen, Hypotension, Thoraxschmerzen und Kurzatmigkeit [2]. Der Einsatz nichtionischer anstelle ionischer KM war jedoch bei invasiven Untersuchungen an Patienten mit einem höheren Thromboserisiko behaftet [18]. Es wurde beschrieben, daß nichtionische KM in vitro eine starke Aktivierung sowie Aggregation von Plättchen hervorriefen und die thrombozytäre Expression von CD62 und CD63 massiv steigerten, ohne das Bindungsverhalten von Antikörpern an diese Epitope zu beeinflussen [13, 29]. Die durch nichtionische KM bewirkte Thrombozytenaktivierung beruhte vermutlich zu 25 % auf der verminderten Ionenstärke und zu 75 % auf der vermehrten Osmolalität des KM-Blut-Gemisches im Vergleich zu Vollblut [30].

Im Gegensatz dazu wiesen ionische KM antikoagulatorische Eigenschaften auf und reduzierten das Risiko ischämischer Komplikationen nach einer PTCA [27, 29]. Sie verursachten eine Aktivierung, jedoch keine Aggregation von Plättchen. Ionische KM hemmten die Anlagerung von Thrombin an Thrombozyten und damit die thrombininduzierte Plättchenaktivierung [29, 48].

Folgende Mechanismen könnten im Zusammenhang mit den Wechselwirkungen zwischen KM und Thrombozyten stehen [22]:

1. Durch die hohen Injektionsgeschwindigkeiten steigt der Anteil von KM im Blut in der Umgebung der Katheterspitze auf bis zu 50 % an [13, 29].
2. Zunehmende Konzentrationen des KM führen zu einer vermehrten Viskosität und Verlangsamung des Blutflusses im Endstromgebiet.
3. Daraus ergibt sich eine verlängerte Ischämiedauer im betreffenden Gefäßabschnitt sowie eine längere Kontaktzeit des KM mit den Endothelien, wodurch eine vermutete toxische Schädigung der Gefäße gefördert wird.
4. Eine verlängerte Kontaktzeit des KM mit den Endothelien und Blut führt wahrscheinlich zur lokalen Freisetzung prothrombotischer und vasoaktiver Substanzen, welche die Plättchenaktivierung und ihre Aggregation fördern [13].

Der Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe KM (siehe 4.2.1) zeigte, daß die nativen Blutproben aus dem arteriellen Bereich und dem lokalen Effluat zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA eine signifikant geringere Relativzahl aktivierter Thrombozyten als unmittelbar nach der DSA aufwiesen.

Der sowohl arteriell als auch venös verminderte prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA könnte auf einer verkürzten Lebensdauer zirkulierender Plättchen beruhen [17]. Es wurde beschrieben, daß die mittlere Lebensdauer von Thrombozyten infolge einer PTA durch einen gesteigerten Abbau in der Milz von 185 auf 145 Stunden sank [57]. Eventuell waren bereits präinterventionell aktivierte Plättchen in besonderem Maße von einer frühzeitigen Konsumption betroffen [40].

Aus der zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA im lokalen Effluat nachweisbaren Abnahme der Relativzahl aktivierter Thrombozyten entwickelten wir die Theorie der Anlagerung von Plättchen an Gefäßwände des arteriellen bzw. peripheren Stromgebietes oder an andere Blutzellen:

Möglicherweise waren 4 Stunden nach der intraarteriellen DSA weniger aktivierte Plättchen im lokalen Effluat als vor der Intervention aufzufinden, weil einige Thrombozyten während der Passage der manipulierten Gefäße sehr stark aktiviert wurden und aufgrund einer folgenden Anlagerung an arterielle bzw. periphere Gefäßstrukturen die venöse Schleuse nicht mehr erreichen konnten.

Denkbar ist außerdem, daß sich einige im alterierten Gefäßabschnitt aktivierte Plättchen an Leukozyten (bevorzugt Monozyten und neutrophile Granulozyten) sowie Erythrozyten anlagerten [5, 55] und demzufolge von der Meßmethode nicht mehr erfaßt wurden.

Da die statistisch belegten Unterschiede jedoch nur sehr geringe Beträge aufwiesen (in einigen Fällen in der Größenordnung des Variationskoeffizienten der Intra-Assay-Varianz) und im prozentualen Anteil aktivierter Thrombozyten zwischen dem arteriellen und venösen Stromgebiet keine nachweisbaren signifikanten Differenzen bestanden (siehe 4.2.3), nahm die Anlagerung aktivierter Plättchen bei der intraarteriellen DSA wahrscheinlich nur ein geringes Ausmaß an.

Die in vitro aktivierten arteriellen Proben ließen zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA eine signifikant höhere Relativzahl sensibilisierter Thrombozyten in bezug auf das Ausgangsniveau erkennen. Bei den in vitro aktivierten venösen Proben zeigte sich zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA zusätzlich ein signifikant gesteigener prozentualer Anteil sensibilisierter Thrombozyten im Vergleich zum Zeitpunkt unmittelbar nach der Intervention (siehe 4.2.1).

Daraus läßt sich ableiten, daß die intraarterielle DSA die Sensibilität von Thrombozyten gegenüber Aktivierungsreizen im arteriellen Bereich und im lokalen Effluat steigerte. In Anbetracht folgender Gründe gehen wir jedoch davon aus, daß dieser Prozeß nicht zu einer Anlagerung sensibilisierter Plättchen an Gefäßoberflächen bzw. andere Blutzellen führte:

1. Die statistisch belegten Unterschiede waren durch geringe Beträge gekennzeichnet.
2. Es ließen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Differenzen in den Relativzahlen sensibilisierter Plättchen zwischen dem arteriellen und venösen Bereich aufzeigen (siehe 4.2.3).
3. Höhere Mengen an während der intraarteriellen DSA zugeführtem KM korrelierten zwar nachweisbar mit einem Sensibilitätsabfall der Thrombozyten im lokalen Effluat zum Zeitpunkt 4 h nach der Intervention (siehe 4.4.2.1), die Sensibilität stieg jedoch insgesamt.

Zusammenfassend kann anhand unserer Daten festgestellt werden, daß die intraarterielle DSA einen signifikanten Einfluß auf die Aktivierung und Sensibilität der Thrombozyten am Beginn der manipulierten Gefäßabschnitte und im lokalen Effluat ausübt. Dieser Einfluß wird zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA nachweisbar, äußert sich in einem geringen Abfall der Relativzahl aktivierter sowie in einem leichten Anstieg des prozentualen Anteils sensibilisierter Plättchen und ist eine Folge der KM- und Heparin-Applikation, da alle anderen Einflußfaktoren konstant blieben. Der Abfall der Aktivierung beruht wahrscheinlich auf einer verkürzten Lebensdauer zirkulierender Thrombozyten oder auf einer geringe Ausmaße annehmenden Anlagerung von Plättchen an arterielle bzw. periphere Gefäßstrukturen oder an andere Blutzellen. Die vermehrte Sensibilität von Plättchen führt vermutlich nicht zu einer Anlagerung.

5.2.2 Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA

Zirkulierende Thrombozyten werden aktiviert, wenn sie z. B. Koronargefäße passieren, welche infolge einer PTCA Endothelläsionen aufzeigen [71]. Weiterhin wurde beobachtet, daß die Expression von CD62 auf zirkulierenden Plättchen 4 - 8 Stunden nach einer PTCA sank, um nach 24 - 48 Stunden wieder anzusteigen. Der Abfall der Expression wurde auf eine Sequestration und verringerte Lebensdauer stark aktivierter Plättchen, der spätere Anstieg auf einen Nachschub von Thrombozyten aus dem Knochenmark zurückgeführt [24]. Ähnliche Ergebnisse liegen von Bypass-Operationen vor: Patienten hatten nach einer kardiopulmonalen Bypass-Operation vorübergehend erhöhte Werte aktivierter, CD62-positiver Thrombozyten [5, 17].

Beim Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA (siehe 4.2.2) wurde deutlich, daß die nativen venösen Blutproben zum Zeitpunkt 4 h nach dem Eingriff eine signifikant geringere Relativzahl aktivierter Thrombozyten als direkt nach der PTA aufwiesen. Die nativen arteriellen Proben zeigten zum Zeitpunkt 4 h nach PTA einen signifikanten Abfall des prozentualen Anteils aktivierter Plättchen in bezug auf die Ausgangswerte.

Die Tatsache, daß ein Abfall der Relativzahl aktivierter Thrombozyten zum Zeitpunkt 4 h nach der PTA im lokalen Effluat nachzuweisen war, unterstützt unsere Theorie der Anlagerung:

Aktivierete Plättchen erschienen in einem geringeren prozentualen Anteil im lokalen Effluat, da sie im manipulierten Gefäßgebiet sehr stark aktiviert wurden und sich an Gefäßstrukturen im arteriellen bzw. peripheren Bereich anlagerten. Alternativ bestand die Möglichkeit, daß sich diese Thrombozyten im lokalen Effluat nicht mehr nachweisen ließen, weil sie aufgrund der starken Aktivierung Komplexe mit anderen Blutzellen ausbildeten und sich im Scatterplot-Diagramm für FSC und SSC außerhalb des markierten Meßbereiches befanden.

Auch eine verkürzte Lebensdauer zirkulierender aktivierter Thrombozyten könnte die beschriebenen Ergebnisse im arteriellen und venösen Stromgebiet erklären.

Folgende Gründe sprechen jedoch dafür, daß diese Prozesse zum Zeitpunkt 4 h nach der PTA vermutlich nur ein geringes Ausmaß annahmen:

1. Die Beträge der statistisch belegten Unterschiede waren auch hier nur sehr gering.
2. Es bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Differenzen in bezug auf den prozentualen Anteil aktivierter Thrombozyten zwischen der systemischen arteriellen Zirkulation und dem lokalen Effluat (siehe 4.2.4). Somit konnte die Hypothese der Anlagerung bzw. Komplexbildung nicht erhärtet werden.
3. Höhere Mengen an zugeführtem KM korrelierten signifikant mit einem Ansteigen der Relativzahl aktivierter Plättchen im lokalen Effluat zum Zeitpunkt 4 h nach der PTA (siehe 4.4.4.1).

Anhand der in vitro aktivierten arteriellen und venösen Blutproben ließen sich beim Vergleich der 3 Abnahmezeitpunkte in der Gruppe PTA keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil sensibilisierter Thrombozyten erkennen (siehe 4.2.2). Außerdem wichen die Relativzahlen sensibilisierter Plättchen im arteriellen und venösen Stromgebiet nicht signifikant voneinander ab (siehe 4.2.4). Demzufolge konnten wir einen Einfluß der PTA auf die Sensibilität zirkulierender Plättchen nicht nachweisen.

Unsere Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die PTA hat eine signifikante Auswirkung auf die Aktivierung von Plättchen in der systemischen arteriellen Zirkulation und im lokalen Effluat. Dieser Einfluß äußert sich in einem nachweisbaren Abfall der Thrombozytenaktivierung zum Zeitpunkt 4 h nach der PTA und ist sowohl eine Folge des zugeführten KM als auch der Dilatation der Gefäßwände. Die PTA führt vermutlich zu einer nur geringe Ausmaße annehmenden Anlagerung aktivierter Plättchen an arterielle bzw. periphere Gefäßstrukturen oder andere Blutzellen. Auch eine verkürzte Lebensdauer zirkulierender Thrombozyten könnte als Ursache für unsere Beobachtungen in Frage kommen. Auf die Sensibilität zirkulierender Plättchen übt die PTA keinen beweisbaren Einfluß aus.

In der Pathogenese der Thrombozytenaktivierung während der PTA ergänzen sich die Effekte der Gefäßschädigung und des KM: Der Prozeß der Ballon-Dilatation verursacht eine lokale Überdehnung eines Gefäßabschnittes. Dieses Barotrauma kann zu Mikro- und Makrodissektionen der Gefäßwand führen. Nach der folgenden angiographischen Gefäßdarstellung ist es möglich, daß innerhalb der Dissektionen sehr hohe KM-Konzentrationen über längere Zeit auftreten und zusammen mit den freigelegten subendothelialen Strukturen und der lokalen Thrombingeneration eine Aktivierung der Thrombozyten bewirken [13].

5.2.3 Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten in der Gruppe KM

In der Gruppe KM ließ sich zu keinem Zeitpunkt der Beweis für eine signifikante Differenz in der Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Plättchen zwischen dem arteriellen Stromgebiet und dem venösen lokalen Effluat der alterierten Gefäßabschnitte erbringen (siehe 4.2.3).

In dieser Studie kann demzufolge innerhalb der Gruppe KM kein beweisbarer Unterschied in der Thrombozytenaktivierung zwischen den Gefäßgebieten, die dem Ort der Manipulation vor- und nachgeschaltet waren, festgestellt werden. Die Schlußfolgerungen daraus wurden unter 5.2.1 diskutiert.

5.2.4 Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten in der Gruppe PTA

Auch in der Gruppe PTA bestand zu keinem Abnahmezeitpunkt eine signifikante Differenz im prozentualen Anteil aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten zwischen dem arteriellen und venösen Stromgebiet (siehe 4.2.4).

Somit existieren auch bei der Intervention PTA keine nachweisbaren Unterschiede in der Plättchenaktivierung zwischen den Gefäßabschnitten, welche dem Ort der Manipulation vorausgingen oder folgten (siehe 5.2.2).

5.3 Vergleich der Gruppe KM mit der Gruppe PTA

Die Intervention PTA beeinflusst die Thrombozytenaktivierung, der Eingriff intraarterielle DSA zusätzlich die Sensibilität der Plättchen.

In der Gruppe KM wird dieser Einfluß jeweils zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA nachweisbar. Dabei kommt es jedoch wahrscheinlich nur zu einer sehr geringfügigen Anlagerung aktivierter Thrombozyten an Gefäßstrukturen bzw. andere Blutzellen oder zu einer Herabsetzung der Lebensdauer zirkulierender aktivierter Plättchen. Die vermehrte Sensibilität von Thrombozyten führt vermutlich nicht zu einer Anlagerung.

Die PTA wirkt sich auf die Aktivierung der Plättchen zum Zeitpunkt 4 h nach der Intervention aus, führt dabei vermutlich aber auch nur in einem sehr geringen Ausmaß zu einer Anlagerung von Thrombozyten bzw. verkürzten Lebensdauer zirkulierender aktivierter Plättchen.

Während in der Gruppe KM das KM den wichtigsten Einflußfaktor darstellte, wirkten auf die Meßergebnisse der Gruppe PTA nachweisbar die Faktoren KM und Gefäßdilatation ein. Hier wurden die beiden Interventionen anhand relativer prozentualer Differenzen direkt miteinander verglichen, um herauszufinden, ob einer der beiden Eingriffe eine stärkere Aktivierung, Sensibilisierung oder Anlagerung der Thrombozyten verursachte.

Beim Vergleich der nativen arteriellen Proben zwischen den Gruppen KM und PTA anhand der relativen prozentualen vor-nach-Differenzen wurde deutlich, daß die Verteilung der Differenzen bei der Gruppe KM nahezu vollständig im negativen Bereich lag, während sie sich bei der Gruppe PTA mehr auf den positiven Bereich erstreckte (siehe 4.3.1.1). Dieser Unterschied war signifikant. Die negative Lage der Differenzen wurde bei der intraarteriellen DSA von höheren Werten unmittelbar nach dem Eingriff verursacht. Bei der PTA hingegen waren kleinere Werte direkt nach der Intervention für die positive Lage der Differenzen verantwortlich.

Diese Beobachtungen führen zu folgenden Schlußfolgerungen:

1. Bei der intraarteriellen DSA kam es unmittelbar nach dem Eingriff zu einem Anstieg der Relativzahl zirkulierender aktivierter Thrombozyten im arteriellen Stromgebiet.
2. Direkt nach der PTA sank der prozentuale Anteil aktivierter Plättchen in der systemischen arteriellen Zirkulation.
3. In dieser Wirkung unterschieden sich die beiden Interventionen signifikant voneinander.

Alle anderen Vergleiche, auch die der in vitro aktivierten Proben, wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Eingriffen nach.

Die intraarterielle DSA bewirkte unmittelbar nach dem Eingriff eine Zunahme der Relativzahl zirkulierender aktivierter Thrombozyten im arteriellen Stromgebiet.

Diese Beobachtung spricht für eine Aktivierung, jedoch gegen eine Anlagerung von Plättchen und unterstützt die oben beschriebenen Ergebnisse (siehe 5.2.1).

Direkt nach der PTA kam es zu einer Senkung des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation. Somit äußerte sich der Einfluß der PTA auf die Thrombozytenaktivierung in einem unmittelbar nach und 4 h nach (siehe 5.2.2) der Intervention belegbaren Abfall der Relativzahl aktivierter Plättchen. Dieser Abfall könnte auf eine Anlagerung bzw. eine verkürzte Lebensdauer aktivierter Thrombozyten zurückzuführen sein.

Da die Theorie der Anlagerung durch den Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten (siehe 5.2.4) nicht unterstützt wird, ist vermutlich nur eine kleine Menge aktivierter Thrombozyten direkt nach dem Eingriff zum Anlagern befähigt.

Die Gruppen KM und PTA wichen hinsichtlich der relativen prozentualen Differenzen zwischen den Zeitpunkten vor und 4 h nach den Eingriffen nicht signifikant voneinander ab (siehe 4.3.2). Deshalb ist es nicht möglich, einen Unterschied zwischen den Interventionen, der sich auf diese Differenzen bezieht, nachzuweisen. Das könnte auf eine Abschwächung des Einflusses der intraarteriellen DSA und der PTA auf die Prozesse der Aktivierung und Sensibilisierung von Thrombozyten in den 4 Stunden nach den Eingriffen hindeuten.

5.4 Einflüsse auf die Gruppen KM und PTA

Die bisherigen Ergebnisse ließen erkennen, daß die intraarterielle DSA und die PTA geringe qualitative Veränderungen der Aktivierung und der Sensibilität von Thrombozyten hervorrufen. Mit dem „Modell der bivariaten Korrelation nach Spearman“ sollte überprüft werden, ob die gemessenen Werte in den Gruppen KM und PTA von der Quantität unterschiedlicher Interventionsbedingungen (Mengen an Heparin und KM, Dilatationszeiten und -strecken) abhängen.

5.4.1 Einflüsse auf die Gruppe KM

5.4.1.1 Einfluß der KM-Menge

In unserer Studie bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der während der DSA zugeführten KM-Menge und dem prozentualen Anteil sensibilisierter Thrombozyten im venösen Stromgebiet zum Zeitpunkt 4 h nach der Intervention in bezug auf die Ausgangswerte. Steigende KM-Mengen gingen dabei mit einer kleiner werdenden Relativzahl sensibilisierter Plättchen im lokalen Effluat einher (siehe 4.4.2.1). Dieser Zusammenhang könnte auf eine Anlagerung sensibilisierter Thrombozyten bzw. ihre

verkürzte Lebensdauer hindeuten. Trotzdem ist der Einfluß des KM auf die Anlagerung und Lebensdauer von Plättchen im Rahmen der intraarteriellen DSA als gering einzuschätzen, da die Sensibilität der Plättchen insgesamt zunahm (siehe 5.2.1) und eine Einwirkung der KM-Menge auf den prozentualen Anteil aktivierter Thrombozyten zum Zeitpunkt 4 h nach der DSA nicht nachweisbar war (siehe 4.4.2.1). Weiterhin korrelierten die Werte unmittelbar nach der Intervention nicht signifikant mit der KM-Menge (siehe 4.4.1.1).

Die bisherigen Beobachtungen lassen eine nur unbedeutende qualitative und quantitative Wirkung des KM, welches den wichtigsten Einflußfaktor während der intraarteriellen DSA darstellt, auf die Aktivierung und die Sensibilität von Plättchen vermuten. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte eine Studie, welche die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten im Rahmen einer Koronarangiographie sowie einer PTCA untersuchte [75].

5.4.1.2 Einfluß der Heparinmenge

Wir registrierten eine signifikante Abhängigkeit der Relativzahl aktivierter Thrombozyten von der Heparinmenge im venösen Stromgebiet direkt nach und 4 h nach der intraarteriellen DSA im Vergleich zu den Ausgangswerten. Größere applizierte Mengen an Heparin führten zu einem Anstieg des prozentualen Anteils aktivierter Plättchen im lokalen Effluat unmittelbar nach und 4 h nach dem Eingriff in bezug auf das Ausgangsniveau (siehe 4.4.1.2 und 4.4.2.2).

Eine heparininduzierte Thrombozytenaktivierung konnte in vivo und in vitro nachgewiesen werden und kam als Ursache für die begrenzte Effektivität des Heparins hinsichtlich der Prävention arterieller Thrombosen in Frage [4, 90]. In vitro wurde jedoch gezeigt, daß Heparin in sehr hohen Dosen (100 I. E./ml) die Expression von CD62 und die Downregulation von GPIb unabhängig von der Interaktion mit Antithrombin III und der Gerinnungskaskade hemmte und einen potenten Inhibitor der Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten darstellte [67]. Andererseits wurde beschrieben, daß Heparin in den üblichen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Degranulation hatte [13, 71] und nicht in der Lage war, die Aktivierung und Aggregation von Plättchen zu verhindern [29].

Wahrscheinlich ist in dieser Studie der Einfluß des Heparins auf die Meßwerte der Gruppe KM unbedeutend, da ein Anstieg der Zahl aktivierter Plättchen im lokalen Effluat gegen eine Anlagerung spricht und nur jeder dritte Patient während der intraarteriellen DSA Heparin erhielt. Außerdem wirkt sich die Heparinmenge während der Intervention nicht nachweisbar auf die Meßwerte der in vitro aktivierten Proben aus (siehe 4.4.1.2 und 4.4.2.2).

5.4.2 Einflüsse auf die Gruppe PTA

5.4.2.1 Einfluß der KM-Menge

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der während der PTA applizierten KM-Menge und der Relativzahl aktivierter Thrombozyten im arteriellen Stromgebiet unmittelbar nach der PTA in bezug auf das Ausgangsniveau nachgewiesen werden (siehe 4.4.3.1). Steigende KM-Mengen führten zu einem verringerten prozentualen Anteil aktivierter Plättchen in der systemischen arteriellen Zirkulation direkt nach der Intervention im Vergleich zu den Ausgangswerten. Die KM-Menge übte aufgrund dieses Ergebnisses einen Einfluß auf den oben beschriebenen Abfall der Relativzahl aktivierter Thrombozyten unmittelbar nach der PTA (siehe 5.3) aus. Das Ausmaß dieses Einflusses ist jedoch als gering einzuschätzen, da selbst doppelte Mengen an KM, die bei der intraarteriellen DSA zum Einsatz kamen, vermutlich nur unbedeutend auf die Aktivierung und Anlagerung von Plättchen sowie ihre Lebensdauer einwirken (siehe 5.4.1.1).

Weiterhin bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der KM-Menge und dem prozentualen Anteil aktivierter Thrombozyten im venösen Stromgebiet zum Zeitpunkt 4 h nach der PTA in bezug auf die Ausgangswerte (siehe 4.4.4.1). Wachsende KM-Mengen bewirkten eine Zunahme der Relativzahl aktivierter Plättchen im lokalen Effluat. Diese Beobachtung wurde unter 5.2.2 diskutiert.

Anhand der in vitro aktivierten Proben konnte eine Abhängigkeit der Sensibilität zirkulierender Plättchen von der Menge an zugeführtem KM nicht bewiesen werden (siehe 4.4.3.1 und 4.4.4.1).

5.4.2.2 Einfluß der Dilatation

Es bestand ein nachweisbarer signifikanter Einfluß des Dilatationsindex auf den prozentualen Anteil aktivierter Thrombozyten im arteriellen Stromgebiet direkt nach der PTA im Vergleich zum Ausgangsniveau (siehe 4.4.3.2). Längere Dilatationszeiten und zunehmende Ballonlängen führten zu einer verminderten Relativzahl aktivierter Plättchen in der systemischen arteriellen Zirkulation unmittelbar nach der PTA in bezug auf die Werte vor der Intervention. Hier waren die Meßwerte der nativen venösen und der in vitro aktivierten Proben sowie die relativen prozentualen Differenzen, die zwischen den Meßwerten vor und 4 Stunden nach der PTA bestanden, nicht in der Lage, eine Abhängigkeit vom Dilatationsindex zu beweisen (siehe 4.4.3.2 und 4.4.4.2).

Diese Beobachtungen machen deutlich, daß die beschriebene Verringerung des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten direkt nach der PTA (siehe 5.3) von der Dilatationsdauer und der Ballonlänge abhängt. Der nachweisbare Abfall der Relativzahl aktivierter Plättchen im arteriellen Stromgebiet kann wahrscheinlich auf eine Anlagerung aktivierter Thrombozyten an Gefäßstrukturen bzw. an andere Blutzellen oder auf eine verminderte Lebensdauer zirkulierender Plättchen zurückgeführt werden. Offenbar ist jedoch nur eine kleine Zahl aktivierter Thrombozyten direkt nach der PTA zum Anlagern befähigt, da

sich die Theorie der Anlagerung durch den Vergleich der arteriellen mit den venösen Werten nicht erhärten läßt (siehe 5.2.4).

Da eine Wirkung des Heparins auf die Plättchen nicht nachzuweisen (siehe 4.4.3.3 und 4.4.4.3) und die Bedeutung des KM nur als sehr gering zu bewerten ist (siehe 5.4.2.1), stellt die Dilatation der Gefäßwände den wichtigsten Einflußfaktor auf die Thrombozytenaktivierung bei der PTA dar. Ähnliche Ergebnisse liegen von einer Studie vor, in der die Interventionen Koronarangiographie und PTCA hinsichtlich der Plättchenaktivierung miteinander verglichen wurden [35].

Wir konnten zwischen dem Dilatationsindex und der Relativzahl aktivierter Thrombozyten im arteriellen Stromgebiet zum Zeitpunkt 4 Stunden nach der PTA bezüglich des Ausgangsniveaus keine signifikanten Unterschiede nachweisen (siehe 4.4.4.2 und 5.3).

Deshalb gehen wir davon aus, daß sich der Einfluß der PTA auf die Prozesse der Aktivierung und Anlagerung von Thrombozyten in den 4 Stunden nach der Intervention abschwächt.

5.4.2.3 Einfluß der Heparinmenge

Unterschiedliche während der PTA verabreichte Heparinmengen wirkten sich nicht beweisbar auf die Aktivierung und die Sensibilität der Plättchen aus. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung des geringfügigen Einflusses des Heparins auf die Meßwerte der Gruppe KM.

5.5 Methodenkritik

5.5.1 Anforderungen an die Methode

Eine Methode, die geeignet ist, zirkulierende aktivierte Thrombozyten ex vivo zu untersuchen, soll folgende Bedingungen erfüllen [76]:

1. Die aktivierten Thrombozyten müssen möglichst aus dem Gefäß entnommen werden, in welches sie nach der Passage des Ortes der Aktivierung abströmen.
2. Die Abnahme- und Aufbereitungsprozedur darf keinen zusätzlichen Aktivierungs-Stimulus ausüben.
3. Die Thrombozyten müssen in einen stabilen Zustand gebracht werden, der bis zum Abschluß der Analyse andauert.

Weiterhin muß die Meßmethode die Voraussetzung dafür schaffen, Informationen über Prozesse der Thrombozytenaktivierung zu erhalten.

5.5.2 *Abnahme der Blutproben*

Während und unmittelbar nach den Interventionen intraarterielle DSA und PTA erreichten wir durch die Blutabnahme aus den Schleusen eine geringe Distanz zwischen Aktivierungs- und Entnahmeort der Thrombozyten. Die arterielle Schleuse (in der Arteria femoralis communis) befand sich vor dem bzw. am Beginn des manipulierten Gefäßgebietes und die venöse Schleuse (in der Vena femoralis) im Abstrombereich. Bei den Kontrollgruppen gelang es, mit den durch periphere Venenpunktionen erhaltenen Blutproben Aussagen über das allgemeine Niveau der Plättchenaktivierung zu treffen und Vergleiche mit den Blutproben anzustellen, die wir mit Hilfe einer venösen Schleuse entnahmen.

Werden strömende Thrombozyten hohen Schergeschwindigkeiten ausgesetzt, hat das eine Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Plättchen zur Folge. Je mehr die Schergeschwindigkeiten ansteigen und je länger dieser Einfluß auf die Thrombozyten einwirkt, desto größer ist das Ausmaß der genannten Wirkungen [64]. Ein initiales Ereignis im Prozeß der strömungsinduzierten Plättchenaggregation scheint die Bindung von vWF an GPIIb zu sein [41], im weiteren Verlauf bilden sich neben Thrombozytenaggregaten auch Formationen thrombozytärer Mikropartikel heraus [33, 42]. Um die physiologischen Schergeschwindigkeiten von $106 - 500 \text{ s}^{-1}$ [34] nicht zu überschreiten, führten wir die Abnahmen unter minimaler Aspiration durch.

Mit den Agonisten ADP und Phorbolmyristatazetat stimulierte Thrombozyten zeigten in EDTA-Blut so gut wie keine Aggregation im Gegensatz zu dramatischen Anstiegen der Aggregation in Heparin- und Zitratblut [6, 72]. Aus diesem Grund kam in dieser Studie EDTA als Antikoagulans zur Anwendung.

Die in unserer Studie vermutete Anlagerung aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten infolge einer DSA und PTA könnte näher untersucht werden, wenn die Blutproben statt aus Schleusen mit Hilfe von Kathetern präinterventionell proximal und postinterventionell distal der manipulierten arteriellen Gefäßabschnitte entnommen würden, was in der Durchführung und ethisch problematisch ist.

5.5.3 *Aufbereitung der Blutproben*

Durch die mit dem Stabilisierungsmittel CyFixII unmittelbar nach der Abnahme der Blutproben durchgeführte Fixierung der nativen Proben konnten die spezifischen, für die Aktivierung der Thrombozyten charakteristischen Epitope bis zur Messung mit wenig Aufwand konstant gehalten werden. Das gleiche galt für die in vitro aktivierten Proben. Das weitverbreitete Fixierungsmittel Formaldehyd wendeten wir in dieser Studie nicht in reiner Form an, da ein dosisabhängiger Effekt auf die Expression von CD62 und CD63 nachgewiesen wurde, der mit üblichen Konzentrationen zu ungenauen Messungen führte [11].

Nach Modifizierung der unter [70] angegebenen Methode waren keine weitergehende Präparationen der Plättchen wie z. B. Waschschritte erforderlich, welche den Zustand ihrer Aktivierung hätten beeinflussen können. Indem wir den Blutproben vor ihrer in-vitro-Aktivierung das Tetrapeptid Gly-Pro-Arg-Pro zu-

setzten, vermieden wir die Entstehung von Thrombozytenaggregaten und damit eine Hauptfehlerquelle bei der Messung aktivierter Plättchen.

5.5.4 Messung der Blutproben

Mit der in dieser Studie angewendeten Durchflußzytometrie konnten spezifische physikalische und chemische Eigenschaften von mehreren Tausend einzelnen Zellen pro Sekunde analysiert werden. Ein sehr großer Vorteil dieser Methode bestand in der Verarbeitung von Vollblutproben, da die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung weniger anfällig gegenüber Störfaktoren waren und keine aufwendigen Techniken zur Aufbereitung bzw. Trennung einzelner Zellpopulationen angewendet werden mußten. Die Immunmarkierung mit den für aktivierte Thrombozyten spezifischen Antikörpern zusammen mit der durchgeführten Abnahmemethode erlaubte die Bestimmung des Ortes und der Zeit der Aktivierung der Plättchen während der Interventionen. Die Sensitivität dieser Methode war so hoch, daß bei entsprechend gefärbten Proben 2 aktivierte Plättchen unter 100 Thrombozyten noch erkannt werden konnten [5, 17].

P-Selectin (CD62) und LIMP-CD63 sind Membran-Bestandteile von Thrombozytengranula und haben die Eigenschaft, nicht auf der Zelloberfläche ruhender Plättchen zu erscheinen. Nach der Aktivierung der Thrombozyten verschmelzen die Granula-Membranen im Rahmen der Exozytose mit der Oberflächenmembran der Plättchen, so daß die beiden GP als Oberflächen-Antigene zur Verfügung stehen. Deshalb waren die in unserer Studie verwendeten Antikörper gegen CD62 und CD63 dafür geeignet, als Aktivierungsmarker zu fungieren [11]. Da die beiden Antigene erst in einem relativ späten Stadium der Thrombozytenaktivierung, nach der Degranularisierung, erschienen, war es uns nicht möglich, frühzeitige durch die Aktivierung ausgelöste Veränderungen von Zellstrukturen zu analysieren [5]. Das könnte eine Ursache für die überwiegend sehr geringen Beträge der bei der Datenanalyse in unserer Studie nachgewiesenen statistisch signifikanten Differenzen darstellen. Für eine Bestimmung der Eigenschaften nur schwach aktivierter Plättchen sowie zur Differenzierung prä- und postinterventionell aktivierter Thrombozyten müßten Methoden entwickelt werden, welche frühere Phasen im Prozeß der Aktivierung und Sensibilisierung von Plättchen erfassen.

Die Verwendung von direkt mit FITC bzw. R-Phycoerythrin konjugierten Antikörpern machte den Einsatz zusätzlicher Antikörper und weiterer Aufbereitungsprozeduren, die eine unkontrollierte in-vitro-Aktivierung der Thrombozyten hätten verursachen können, überflüssig. Da die Antikörper eine monoklonale Abstammung besaßen, verringerte sich die Wahrscheinlichkeit des Auftretens unspezifischer Bindungen [76]. Die Konstanz der unspezifischen Bindungen überprüften wir durch die statistische Auswertung der Meßwerte jeweils mitgeführter Blutproben, welche mit FITC-markierten isotypischen Maus-IgG1-Kontroll-Antikörpern gefärbt waren (Isotypkontrollen).

Es wurde gezeigt, daß die Erfassung der Formveränderung von Plättchen einen sensibleren Indikator für die in-vitro-Aktivierung darstellt als die Untersuchung der Expression aktivierungsspezifischer Oberflä-

chen-Antigene. Da die Formveränderung jedoch reversibel ist, konnten wir sie nicht als Grundlage für die Bewertung in vivo aktivierter Thrombozyten heranziehen. Die Bestimmung der Expression spezifischer Oberflächen-Antigene hingegen hat für klinische Aussagen über die Eigenschaften von Thrombozyten in vivo eine höhere Sensitivität [70]. Deshalb bildete sie die Grundlage für die Meßmethode in dieser Studie und wurde auch für die Analyse der in vitro aktivierten Plättchen verwendet, um vergleichbare Daten zu erhalten.

Ein Problem bei der Analyse der Thrombozyten in einem Durchflußzytometer stellt die richtige Eingrenzung der Thrombozytenpopulation im Scatterplot-Diagramm für FSC und SSC dar (gating, siehe 3.4.3). Dabei müssen folgende Faktoren berücksichtigt werden:

1. Das Streulicht ist nicht nur von vorgegebenen Faktoren wie Wellenlänge und Gestalt des Laserstrahles sowie der Anordnung der Detektoren abhängig, sondern auch von veränderlichen Größen wie dem Zellvolumen, der Gestalt und inneren Struktur der Zellen, ihrer Orientierung im Strom der Durchflußkammer und dem Brechungsindex von Zytoplasma und Nukleus [88]. Somit spielten bei unseren Messungen zufällige Einflüsse eine Rolle, deren Ausmaß wir durch die Erfassung großer Zellzahlen begrenzten.
2. Wenn die Anregung der Emission durch einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm erfolgt, entspricht die Autofluoreszenz einer Zelle durchschnittlich der Fluoreszenz von 10000 FITC-Molekülen und ist der wichtigste die Sensitivität limitierende Faktor bei Messungen der extrinsischen Zellfluoreszenz [16]. Da wir größere Zellen mit einer höheren Autofluoreszenz (wie z. B. Leukozyten) durch die Eingrenzung der Thrombozytenpopulation von der Analyse ausschlossen, verringerte sich dieser Einfluß.
3. GPIb (CD42b), ein Bestandteil des GPIb-IX-Komplexes, ist ein auf nicht aktivierten Plättchen in konstanter Menge vorhandener thrombozytenspezifischer Oberflächenrezeptor, der infolge einer Aktivierung mit Agonisten in vitro als auch durch eine Verletzung von Gefäßwänden in vivo unabhängig von der Degranulation downreguliert wird [1, 54]. Trotz der Downregulation ist es mit Hilfe von spezifischen mit R-Phycoerythrin markierten Antikörpern gegen dieses GP möglich, Thrombozyten im Scatterplot-Diagramm zuverlässig zu definieren [6]. Eine Reduktion der Expression von GPIb um 50 % hatte keinen Einfluß auf das Adhäsionsverhalten strömender Thrombozyten [91]. Dennoch besteht eine Beschränkung unserer Methode darin, Ereignisse in der umgrenzten polygonalen Region (siehe 3.4.3) als GPIb-positive Partikel charakterisieren zu müssen und nicht als einzelne Thrombozyten [6]. Durch die vorgenommene Eingrenzung der Thrombozytenpopulation verhinderten wir jedoch die Einbeziehung eventuell noch vorhandener größerer Thrombozytenaggregate in die Messungen.

5.5.5 Statistik

Die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse überprüften wir im Vorfeld der Untersuchungen mit der Bestimmung der Intra-Assay-Varianz an Meßreihen gleicher Blutproben. So konnten wir die durchgeführten Einzelmessungen sowie signifikante Abweichungen in den statistischen Analysen bezüglich des Betrages bzw. der Relevanz beurteilen und verzichteten aus Kostengründen auf Mehrfachbestimmungen.

Eine Einschränkung in der Methode der statistischen Datenanalyse bestand darin, nur Aussagen über Relativzahlen, nicht hingegen über absolute Werte, aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten treffen zu können. Weiterhin waren die Beträge der in unserer Studie aufgezeigten signifikanten Differenzen in der Plättchenaktivierung oftmals sehr gering und lagen in einigen Fällen in der Größenordnung der Intra-Assay-Varianz mit errechneten Variationskoeffizienten von 5 - 10 %. Die Ursache könnte in der Eigenschaft unserer verwendeten Antikörper gegen CD62 und CD63 begründet liegen, relativ späte Stadien in der Thrombozytenaktivierung zu erfassen und somit keine Informationen über frühzeitige Prozesse in der Aktivierung zirkulierender Plättchen bereitzustellen.

Für die Einschätzung der klinischen Bedeutung unserer Ergebnisse wäre es notwendig, Methoden zu entwickeln, die Angaben über absolute Zahlen aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten bereitstellen und frühzeitige Veränderungen im Prozeß der Plättchenaktivierung registrieren. Das Auftreten okklusiver vaskulärer Komplikationen nach den Interventionen DSA und PTA müßte anhand prospektiver Studien analysiert werden.

6 Zusammenfassung

Die Thrombozytenaktivierung ist von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Arteriosklerose und wird bei Patienten mit instabiler Angina pectoris, Myokardinfarkt und transitorischen ischämischen Attacken sowie nach koronarangioplastischen und operativen Eingriffen als Verursacher okklusiver vaskulärer Komplikationen in Betracht gezogen. Es liegen zahlreiche Ergebnisse von Studien vor, die sich hierbei intensiv mit der KHK, Koronarangiographie, PTCA und aortokoronaren Bypass-Operation befaßten.

Wir gingen der Frage nach, ob ein Zusammenhang zwischen PAVK und der Aktivierung zirkulierender Thrombozyten besteht und ob die intraarterielle DSA sowie die PTA im Bereich der unteren Extremitäten die Aktivierung zirkulierender Plättchen beeinflussen. Unsere Studie schloß 16 Kontrollprobanden mit PAVK, 25 gesunde Kontrollprobanden und 36 Patienten ein, von denen 14 einer Angiographie, 12 einer PTA und 10 beiden Eingriffen unterzogen wurden.

Blutabnahmen aus einer peripheren Vene sowie aus Einführungsbestecken in der Arteria und Vena femoralis vor und nach interventionellen Manipulationen erlaubten es, Aussagen über den Ort der Aktivierung bzw. Sensibilisierung von Plättchen zu treffen. Dabei gelang es uns, durch die Fixierung der Blutproben mit CyFixII den zum Abnahmezeitpunkt bestehenden Status der Thrombozytenaktivierung ex vivo zu analysieren. Die Sensibilität der Plättchen bestimmten wir mittels einer zusätzlichen in-vitro-Aktivierung aller Blutproben mit U46619.

Es zeigte sich, daß die angewandte Methode der Durchflußzytometrie unter Verwendung Fluoreszenzfarbstoff-markierter spezifischer Maus-IgG1-Antikörper gegen CD42b, CD62 und CD63 dafür geeignet ist, die Aktivierung zirkulierender Thrombozyten ex vivo und in vitro zu untersuchen. Anhand jeweils mitgeführter isotypischer Negativkontrollen überprüften wir die Konstanz der unspezifischen Bindungen. Die Intra-Assay-Varianz lag im Bereich von 5 - 10 %.

PAVK-Patienten im Stadium II nach Fontaine mit kardiovaskulären Risikofaktoren wiesen eine höhere Relativzahl aktivierter und sensibilisierter Thrombozyten als gesunde Probanden auf.

Die intraarterielle DSA führte 4 Stunden nach dem Eingriff zu einem nachweisbaren Abfall der Aktivierung und einer erhöhten Sensibilität von Plättchen am Beginn der manipulierten Gefäßabschnitte und im lokalen Effluat. Diese Wirkungen sind als Reaktion auf das zugeführte KM zu sehen, welches den wichtigsten Einflußfaktor auf die Meßergebnisse der intraarteriellen DSA darstellt. Aus der zum Zeitpunkt 4 Stunden nach der DSA im lokalen Effluat nachweisbaren Abnahme des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten entwickelten wir die Theorie der Anlagerung von Plättchen an Gefäßwände des arteriellen bzw. peripheren Stromgebietes im manipulierten Bereich oder an andere Blutzellen. Da jedoch die Sensibilität der Thrombozyten stieg und in der Menge aktivierter Plättchen zwischen dem

arteriellen Stromgebiet und dem lokalen Effluat keine signifikanten Unterschiede bestanden, führen wir den Abfall der Relativzahl aktivierter Thrombozyten eher auf ihre verkürzte Lebensdauer zurück.

Die PTA verursachte 4 Stunden nach dem Eingriff einen nachweisbaren Abfall der Relativzahl aktivierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation und im lokalen Effluat der manipulierten Gefäßabschnitte, führte dabei vermutlich aber nur zu einer geringfügigen Anlagerung von Plättchen oder einer reduzierten Lebensdauer zirkulierender aktivierter Thrombozyten. Auf die Sensibilität zirkulierender Plättchen übte die PTA keinen beweisbaren Einfluß aus.

Durch den direkten Vergleich zwischen den Interventionen intraarterielle DSA und PTA anhand relativer prozentualer Differenzen wurde deutlich, daß die PTA auch eine Verringerung des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation unmittelbar nach dem Eingriff verursachte. Diese Beobachtung führen wir auf eine geringfügige Anlagerung bzw. verkürzte Lebensdauer aktivierter Plättchen zurück. Bei der intraarteriellen DSA hingegen spricht die signifikante Zunahme des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten im arteriellen Stromgebiet direkt nach der Intervention gegen eine solche Anlagerung. Die Wirkung beider Interventionen auf die Eigenschaften und Funktionen der Plättchen schien sich in den 4 Stunden nach den Eingriffen abzuschwächen.

Im einzelnen konnten folgende quantitative Zusammenhänge aufgezeigt werden:

Heparin bewirkte unmittelbar nach der intraarteriellen DSA und 4 Stunden später dosisabhängig einen signifikanten Anstieg der Relativzahl aktivierter Thrombozyten im lokalen Effluat mit eher geringer quantitativer Bedeutung. Auf die Meßergebnisse der PTA übte die Heparinmenge keinen nachweisbaren Einfluß aus.

Zunehmende KM-Mengen korrelierten hingegen mit einem kleiner werdenden prozentualen Anteil sensibilisierter Plättchen im lokalen Effluat zum Zeitpunkt 4 Stunden nach der DSA im Vergleich zu den Ausgangswerten. Auch dieser Zusammenhang ist quantitativ zu vernachlässigen.

Das applizierte KM führte volumenabhängig zu einer signifikant verringerten Relativzahl aktivierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation direkt nach der PTA im Vergleich zu den Ausgangswerten. Ferner korrelierten erhöhte Mengen an KM mit einem größer werdenden prozentualen Anteil aktivierter Plättchen im lokalen Effluat zum Zeitpunkt 4 Stunden nach der PTA. Der Einfluß der KM-Menge auf die während der PTA erhobenen Meßwerte ist jedoch als gering anzusehen.

Längere Dilatationszeiten und zunehmende Ballonlängen verursachten einen Abfall der Relativzahl aktivierter Thrombozyten in der systemischen arteriellen Zirkulation direkt nach der PTA in bezug auf das Ausgangsniveau. Diese Beobachtung dürfte auf eine Anlagerung aktivierter Plättchen an manipulierte Gefäßabschnitte bzw. andere Blutzellen oder eine verringerte Lebensdauer der Thrombozyten schließen lassen und betont den Stellenwert des Dilatationsprozesses.

Die PTA führte somit neben einer nachweisbaren Aktivierung zirkulierender Thrombozyten wahrscheinlich zu einer Anlagerung aktivierter Plättchen an Gefäßstrukturen im manipulierten Bereich bzw. andere Blutzellen oder zu einer verkürzten Lebensdauer von Plättchen unmittelbar nach dem Eingriff. Dieser Prozeß schwächte sich offenbar in den 4 Stunden nach der PTA ab. In der Dilatation der Gefäßwände sehen wir den Hauptfaktor für Veränderungen der in dieser Studie untersuchten Eigenschaften und Funktionen von Thrombozyten infolge einer PTA. Die Einwirkung des KM hat in diesem Zusammenhang wohl eine untergeordnete Bedeutung.

Erstmalig wiesen wir nach, daß die Angioplastie in peripheren Gefäßen eine Aktivierung und vermutlich geringe Anlagerung bzw. verkürzte Lebensdauer zirkulierender Plättchen unmittelbar nach der Intervention und 4 Stunden später verursacht. Diese Prozesse sind wahrscheinlich auf Endothelläsionen als Folge der Dilatation zurückzuführen. Wir stellten fest, daß die intraarterielle DSA der Aorta und der Becken- und Beinarterien mit dem Haupteinflußfaktor KM zu einer Aktivierung, Sensibilisierung und in vermutlich sehr geringem Umfang zu einer Anlagerung bzw. verringerten Lebensdauer strömender Plättchen 4 Stunden nach dem Eingriff führt.

Wir konnten eine stärkere Aktivierung und Sensibilisierung von Plättchen bei PAVK-Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren im Vergleich zu gesunden Probanden aufzeigen. Deshalb nehmen wir an, daß präinterventionell aktivierte Thrombozyten in besonderem Ausmaß an den Prozessen der Aktivierung, Sensibilisierung und Anlagerung beteiligt bzw. von einer verkürzten Lebensdauer betroffen sind.

Die statistisch belegten Unterschiede in unserer Studie wiesen teilweise sehr geringe Beträge auf. Außerdem ermöglichte es die angewandte Methode nicht, eine Anlagerung der Thrombozyten an Gefäßstrukturen von einer Anlagerung an andere Blutzellen zu unterscheiden. Für die weitere Abschätzung der klinischen Relevanz der Ergebnisse wäre es daher interessant, sensiblere Methoden zu entwickeln und Komplexbildungen von Plättchen mit Erythrozyten und Leukozyten im Rahmen der intraarteriellen DSA sowie der PTA innerhalb prospektiver Studien zu analysieren.

Literaturverzeichnis

- [1] Adelman B, Michelson AD, et al.: Evaluation of platelet glycoprotein Ib by fluorescence flow cytometry. *Blood* 1985; *66*(2): 423-427.
- [2] Albanese JR, Venditto JA, et al.: Effects of ionic and nonionic contrast media on in vitro and in vivo platelet activation. *Am J Cardiol* 1995; *76*(14): 1059-1063.
- [3] Andrioli G, Ortolani R, et al.: Study of platelet adhesion in patients with uncomplicated hypertension. *J Hypertens* 1996; *14*(10): 1215-1221.
- [4] Arnljots B, Dougan P, et al.: Antithrombotic and platelet activating effects of heparin in prevention of microarterial thrombosis. *Plast Reconstr Surg* 1997; *99*(4): 1122-1128.
- [5] Ault KA, Mitchell JG, et al.: Analysis of platelets. In: Laerum OD, Bjerknes R (Hrsg.): *Flow cytometry in hematology*. London - San Diego - New York; Academic Press, 1992: 153-163.
- [6] Ault KA, Rinder HM, et al.: Correlated measurement of platelet release and aggregation in whole blood. *Cytometry* 1989; *10*(4): 448-455.
- [7] Bassiouny HS, Song RH, et al.: Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury. *J Vasc Surg* 1998; *27*(5): 910-918.
- [8] Brehme S, Riess H, et al.: Krankheiten der Arterien, Venen und Lymphgefäße - Krankheiten der Arterien. In: Stobbe H, Baumann G (Hrsg.): *Innere Medizin*. 7. Aufl. Berlin - Wiesbaden; Ullstein Mosby, 1996: 311-338.
- [9] Broijersens A, Hamsten A, et al.: Platelet activity in vivo in hyperlipoproteinemia - importance of combined hyperlipidemia. *Thromb Haemost* 1998; *79*(2): 268-275.
- [10] Cahill MR, Macey MG, et al.: Platelet surface activation antigen expression at baseline and during elective angioplasty in patients with mild to moderate coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; *7*(2): 165-168.
- [11] Cahill MR, Macey MG, et al.: Fixation with formaldehyde induces expression of activation dependent platelet membrane glycoproteins, P-Selectin (CD62) and GP 53 (CD63). *Br J Haematol* 1993; *84*(3): 527-529.
- [12] Cao J, Rittgers SE: Particle motion within in vitro models of stenosed internal carotid and left anterior descending coronary arteries. *Ann Biomed Eng* 1998; *26*(2): 190-199.

-
- [13] Chronos NAF, Goodall AH, et al.: Profound platelet degranulation is an important side effect of some types of contrast media used in interventional cardiology. *Circulation* 1993; 88(5 Pt 1): 2035-2044.
- [14] Chronos NAF, Wilson DJ, et al.: Aspirin does not affect the flow cytometric detection of fibrinogen binding to, or release of alpha-granules or lysosomes from, human platelets. *Clin Sci (Colch)* 1994; 87(5): 575-580.
- [15] Colman RW, Hirsh J, et al.: Hemostasis and Thrombosis. 3. Aufl. Philadelphia; J.B. Lippincott Company, 1994.
- [16] Coon JS, Weinstein RS: Specimen preparation, cell measurements, and probes for flow cytometry. In: Coon JS, Weinstein RS (Hrsg.): *Diagnostic flow cytometry*. Baltimore - Hong Kong - London; Williams & Wilkins, 1991: 35-43.
- [17] Corash L: Measurement of platelet activation by fluorescence-activated flow cytometry. *Blood Cells* 1990; 16(1): 97-108.
- [18] Corot C, Chronos N, et al.: In vitro comparison of the effects of contrast media on coagulation and platelet activation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7(6): 602-608.
- [19] Creutzig A: Chronische arterielle Verschlusskrankheit der Extremitäten (AVK). In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg.): *Innere Medizin*. 3. Aufl. München - Wien - Baltimore; Urban & Schwarzenberg, 1994: 1021-1031.
- [20] Davi G, Romano M, et al.: Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1998; 97(10): 953-957.
- [21] Eckhardt R: Durchflußzytometrie, eine schnelle und einfache Methode zur Analyse großer Zellzahlen. *Lab Med* 1991; 15: 563-569.
- [22] Favero C del: Kontrastmittel: Eine multifaktorielle Betrachtung. Bracco-Byk Gulden GmbH. Konstanz.
- [23] Garrett KO, Pautler SV, et al.: The inability of low-molecular-weight dextran, aspirin, and prostaglandin E1 to inhibit monolayer platelet adhesion to polyethylene. *J Lab Clin Med* 1993; 122(2): 141-148.
- [24] Gawaz M, Neumann FJ, et al.: Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 1996; 93(2): 229-237.

-
- [25] Gemmell CH, Ramirez SM, et al.: Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leucocytes as material-induced activation events. *J Lab Clin Med* 1995; *125*(2): 276-287.
- [26] Goodman SL, Cooper SL, et al.: Integrin receptors and platelet adhesion to synthetic surfaces. *J Biomed Mater Res* 1993; *27*(5): 683-695.
- [27] Grines CL, Schreiber TL, et al.: A randomized trial of low osmolar ionic versus nonionic contrast media in patients with myocardial infarction or unstable angina undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; *27*(6): 1381-1386.
- [28] Hamamoto K, Ohga S, et al.: Cellular distribution of CD63 antigen in platelets and in three megakaryocytic cell lines. *Histochem J* 1994; *26*(4): 367-375.
- [29] Hay KL, Bull BS: An analysis of platelet activation and aggregation produced by three classes of contrast media. *J Vasc Interv Radiol* 1995; *6*(2): 211-217.
- [30] Hay KL, Bull BS: Factors influencing the activation of platelets by nonionic contrast medium. *J Vasc Interv Radiol* 1996; *7*(3): 401-407.
- [31] Hendricks P, Brassel F, et al.: Nichtoperative interventionelle Verfahren - Perkutane transluminale Angioplastie. In: Alexander K (Hrsg.): *Gefäßkrankheiten*. München - Wien - Baltimore; Urban & Schwarzenberg, 1993: 389-400.
- [32] Henn V, Slupsky JR, et al.: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; *391*(6667): 591-594.
- [33] Holme PA, Orvim U, et al.: Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; *17*(4): 646-653.
- [34] Hung J, Lam JYT, et al.: Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995; *92*(9): 2432-2436.
- [35] Inoue T, Hoshi K, et al.: Early detection of platelet activation after coronary angioplasty. *Coron Artery Dis* 1996; *7*(7): 529-534.
- [36] Ishiwata S, Tukada T, et al.: Postangioplasty restenosis: platelet activation and the coagulation-fibrinolysis system as possible factors in the pathogenesis of restenosis. *Am Heart J* 1997; *133*(4): 387-392.

-
- [37] Itoh T, Nakai K, et al.: Can the risk for acute cardiac events in acute coronary syndrome be indicated by platelet membrane activation marker P-Selectin ? *Coronary Artery Dis* 1995; *6*(8): 645-650.
 - [38] Jung SM, Moroi M: Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions. *J Biol Chem* 1998; *273*(24): 14827-14837.
 - [39] Kawano K, Aoki I, et al.: Human platelet activation by thrombolytic agents: effects of tissue-type plasminogen activator and urokinase on platelet surface P-selectin expression. *Am Heart J* 1998; *135*(2 Pt 1): 268-271.
 - [40] Kolarov P, Tschoepe D, et al.: PTCA: periprocedural platelet activation. Part II of the Duesseldorf PTCA platelet study (DPPS). *Eur Heart J* 1996; *17*(8): 1216-1222.
 - [41] Konstantopoulos K, Chow TW, et al.: Shear stress-induced binding of von Willebrand factor to platelets. *Biorheology* 1997; *34*(1): 57-71.
 - [42] Konstantopoulos K, Wu KK, et al.: Flow cytometric studies of platelet responses to shear stress in whole blood. *Biorheology* 1995; *32*(1): 73-93.
 - [43] Kopp HP, Hopmeier P, et al.: Concentrations of circulating P-selectin are increased in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; *106*(1): 41-44.
 - [44] Kowalska MA, Tuszynski GP, et al.: Plasma lipoproteins mediate platelet adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; *172*(1): 113-118.
 - [45] Krause B, Metzler P: *Angewandte Statistik*. 1. Aufl. Berlin; Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1983.
 - [46] Laudano AP, Doolittle RF: Synthetic peptide derivatives that bind fibrinogen and prevent the polymerisation of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; *75*(7): 3085-3089.
 - [47] Li JM, Podolsky RS, et al.: Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. *J Surg Res* 1996; *61*(2): 543-548.
 - [48] Li X, Gabriel DA: Differences between contrast media in the inhibition of platelet activation by specific platelet agonists. *Acad Radiol* 1997; *4*(2): 108-114.
 - [49] Liu Q, Matsueda G, et al.: The AGDV residues on the gamma chain carboxyl terminus of platelet-bound fibrinogen are needed for platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1997; *1343*(2): 316-326.
 - [50] Lohse H, Ludwig R: *Prüfstatistik*. 1. Aufl. Leipzig; VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1982.

-
- [51] Loppnow H, Bil R, et al.: Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Blood* 1998; *91*(1): 134-141.
- [52] Mahler F: Katheterv Verfahren. In: Kappert A (Hrsg.): *Lehrbuch und Atlas der Angiologie*. 10. Aufl. Bern - Stuttgart - Wien; Huber, 1981: 465-485.
- [53] Metzelaar MJ, Schuurman HJ, et al.: Biochemical and immunohistochemical characteristics of CD62 and CD63 monoclonal antibodies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991; *61*(4): 269-277.
- [54] Michelson AD, Ellis PA, et al.: Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate, or in vivo wound. *Blood* 1991; *77*(4): 770-779.
- [55] Mickelson JK, Lakkis NM, et al.: Leucocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease ? *J Am Coll Cardiol* 1996; *28*(2): 345-353.
- [56] Minar E, Ehringer H, et al.: Platelet deposition at angioplasty sites and its relation to restenosis in human iliac and femoropopliteal arteries. *Radiology* 1989; *170*(3 Pt 1): 767-772.
- [57] Minar E, Ehringer H, et al.: Platelet deposition at angioplasty sites and platelet survival time after PTA in iliac and femoral arteries: investigations with Indium-111-Oxine labelled platelets in patients with ASA-(1.0 g/day)-Therapy. *Thromb Haemost* 1987; *58*(2): 718-723.
- [58] Morse DS, Adams D, et al.: Platelet and neutrophil activation during cardiac surgical procedures: impact of cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998; *65*(3): 691-695.
- [59] Murakami T, Komiyama Y, et al.: Flow cytometric analysis of platelet activation markers CD62P and CD63 in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 1996; *26*(11): 996-1003.
- [60] Nishibori M, Cham B, et al.: The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak Syndrome, and appears identical to granulophysin. *J Clin Invest* 1993; *91*(4): 1775-1782.
- [61] Nurden AT, Nurden P: A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet-vessel wall interaction. *Baillieres Clin Haematol* 1993; *6*(3): 653-690.
- [62] Ostrovsky L, King AJ, et al.: A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood* 1998; *91*(8): 3028-3036.
- [63] de Padua Mansur A, Caramelli B, et al.: Smoking and lipoprotein abnormalities on platelet aggregation in coronary heart disease. *Int J Cardiol* 1997; *62*(2): 151-154.

-
- [64] Rhodes NP, Kumary TV, et al.: Influence of wall shear rate on parameters of blood compatibility of intravascular catheters. *Biomaterials* 1996; *17*(20): 1995-2002.
 - [65] Rhodes NP, Zuzel M, et al.: Granule secretion markers on fluid-phase platelets in whole blood perfused through capillary tubing. *J Biomed Mater Res* 1994; *28*(4): 435-439.
 - [66] Rieger H: [Conservative therapy of arterial occlusive disease]. *Herz* 1989; *14*(1): 1-11.
 - [67] Rohrer MJ, Kestin AS, et al.: High-dose heparin suppresses platelet alpha granule secretion. *J Vasc Surg* 1992; *15*(6): 1000-1009.
 - [68] Rosenblum WI: Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen. *J Vasc Res* 1997; *34*(6): 409-417.
 - [69] Roth JJ, Gahtan V, et al.: Thrombospondin-1 is elevated with both intimal hyperplasia and hypercholesterolemia. *J Surg Res* 1998; *74*(1): 11-16.
 - [70] Ruf A, Patscheke H: Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-Selectin expression. *Semin Thromb Haemost* 1995; *21*(2): 146-151.
 - [71] Scharf RE, Tomer A, et al.: Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. *Arterioscler Thromb* 1992; *12*(12): 1475-1487.
 - [72] Schneider DJ, Tracy PB, et al.: Differential effects of anticoagulants on the activation of platelets ex vivo. *Circulation* 1997; *96*(9): 2877-2883.
 - [73] Schrör K: Antiplatelet drugs. A comparative review. *Drugs* 1995; *50*(1): 7-28.
 - [74] Schultheiß HP, Tschoepe D, et al.: Large platelets continue to circulate in an activated state after myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 1994; *24*(4): 243-247.
 - [75] Serrano CV Jr, Ramires JA, et al.: Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997; *29*(6): 1276-1283.
 - [76] Shattil SH: Why is platelet activation useful for assessing thrombotic risk? What are the advantages and limitations of using flow cytometry to measure platelet activation? *Am J Clin Nutr* 1992; *56*(4 Suppl): 789-790.
 - [77] Storm R: Wahrscheinlichkeitsrechnung, mathematische Statistik und statistische Qualitätskontrolle. 7. Aufl. Leipzig; VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1979.

-
- [78] Terres W, Lund GK, et al.: Endogenous tissue plasminogen activator and platelet reactivity as risk factors for reocclusion after recanalization of chronic total coronary occlusions. *Am Heart J* 1995; *130*(4): 711-716.
- [79] Tschoepe D: Adhesion molecules influencing atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; *30*(Suppl): 19-24.
- [80] Tschoepe D, Driesch E, et al.: Activated platelets in subjects at increased risk of IDDM. DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie. *Diabetologia* 1997; *40*(5): 573-577.
- [81] Tschoepe D, Driesch E, et al.: Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by near-normoglycemia. *Diabetes* 1995; *44*(8): 890-894.
- [82] Tschoepe D, Roesen P, et al.: Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 1993; *19*(2): 122-128.
- [83] Tschoepe D, Schultheiß HP, et al.: Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation* 1993; *88*(1): 37-42.
- [84] Vanhoutte PM: [Endothelial dysfunction and coronary heart disease. Interaction of endothelium and thrombocytes]. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1993; *82*(42): 1161-1166.
- [85] Verkleij MW, Morton LF, et al.: Simple collagen-like peptides support platelet adhesion under static but not under flow conditions: interaction via $\alpha 2\beta 1$ and von willebrand factor with specific sequences in native collagen is a requirement to resist shear forces. *Blood* 1998; *91*(10): 3808-3816.
- [86] Verstraete M, Zoldhelyi P: Novel antithrombotic drugs in development. *Drugs* 1995; *49*(6): 856-884.
- [87] Wagner HH: Aortographie und Arteriographie peripherer Gefäße - Methodik. In: Alexander K (Hrsg.): *Gefäßkrankheiten*. München - Wien - Baltimore; Urban & Schwarzenberg, 1993: 228-230.
- [88] Wheelless, LL Jr.: Flow instrumentation and data analysis. In: Coon JS, RS Weinstein (Hrsg.): *Diagnostic flow cytometry*. Baltimore - Hong Kong - London; Williams & Wilkins, 1991: 17-34.
- [89] White SA, Thompson MM, et al.: Risk factors leading to arterial occlusion following diagnostic arteriography. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; *10*(1): 4-8.
- [90] Xiao Z, Theroux P: Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation* 1998; *97*(3): 251-256.
- [91] van Zanten GH, Heijnen HF, et al.: A fifty percent reduction of platelet surface glycoprotein Ib does not affect platelet adhesion under flow conditions. *Blood* 1998; *91*(7): 2353-2359.

- [92] Zeitler E, Feng G, et al.: [Results of percutaneous transluminal angioplasty]. Herz 1989; *14(1)*: 22-28.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name, Vorname: Buchholz, Alexander

Geburtsdatum: 29.12.1970

Geburtsort: 13591 Berlin-Staaken

Nationalität: deutsch

Wohnort: Pappelallee 7/8, 10437 Berlin

Familienstand: ledig

Schulbildung

1977 - 1987 POS „Lessing-Oberschule“ (heute „Lessing-Grundschule“) in 14612 Finkenkrug

1987 - 1989 EOS „Georgi Dimitroff“ (heute „Goethe-Gymnasium“) in 14641 Nauen, erreichter Abschluß: allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

1989 - 1990 Wehrdienst im „Luftsturmregiment Willi Saenger“ in 14794 Lehnin

Berufsausbildung

1990 - 1991 Ausbildung zum „Krankenpflegehelfer“ in der „Betriebsakademie des Gesundheits- und Sozialwesens im Kreis Nauen“

Hochschulbildung

1991 - 1998 „Humboldt-Universität zu Berlin“: Studiengang Humanmedizin

Auslandsaufenthalt

August 1995 Famulatur an der „Harvard Medical School“, Boston

Ärztliche Tätigkeit

seit Dezember 1998 Arbeit als „Arzt im Praktikum“ in der Inneren Abteilung des „Paulinen-Krankenhauses“, Eschenallee 28, 14050 Berlin